



**HAL**  
open science

## Caractérisation des différents types de fibres musculaires dans plusieurs espèces : production et utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre les chaînes lourdes de myosine rapide IIa et IIb

. Inra Groupe Noé, . Biocytex, Brigitte B. Picard, Louis L. Lefaucheur, Benoit Fauconneau, Hervé Rémignon, Yan Cherel, Eric Barrey, J. Nédelec

### ► To cite this version:

. Inra Groupe Noé, . Biocytex, Brigitte B. Picard, Louis L. Lefaucheur, Benoit Fauconneau, et al.. Caractérisation des différents types de fibres musculaires dans plusieurs espèces : production et utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre les chaînes lourdes de myosine rapide IIa et IIb. *Productions Animales*, 1998, 11 (2), pp.145-163. 10.20870/productions-animales.1998.11.2.3926 . hal-02696314

**HAL Id: hal-02696314**

**<https://hal.inrae.fr/hal-02696314>**

Submitted on 1 Jun 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

## Dossier :

# Caractérisation des différents types de fibres musculaires dans plusieurs espèces : production et utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre les chaînes lourdes de myosine rapide IIA et IIB

INRA Groupe Noé, Société Biocytex

INRA Groupe Noé : B. Picard, L. Lefaucheur, B. Fauconneau, H. Rémignon, Y. Cherel, E. Barrey

Biocytex : J. Nedelec

Le muscle squelettique est constitué de différents types de fibres qui interviennent dans la contraction. Les proportions de ces types de fibres influencent les caractères d'intérêt zootechnique, notamment la qualité organoleptique de la viande dans la plupart des espèces et la performance sportive chez les animaux de course. La mise au point de méthodes de caractérisation des différents types de fibres permettra d'étudier plus précisément les relations entre typologie et caractéristiques musculaires, afin de mieux maîtriser celles-ci.

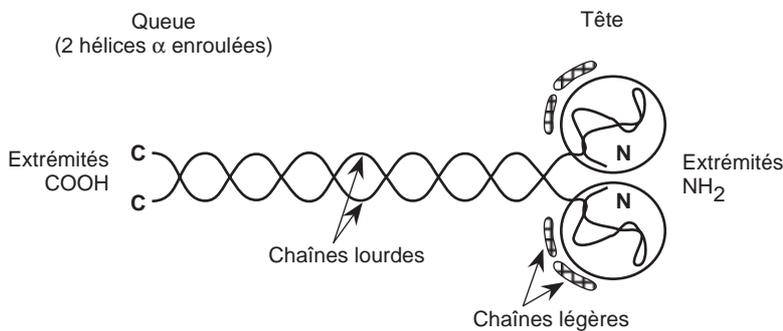
Chez les oiseaux comme chez les mammifères, trois principaux types de fibres sont généralement décrits. Ce sont les types I (rouge lent oxydatif), IIA (rouge rapide oxydolytique) et IIB (blanc rapide glycolytique)

(tableau 1). Cette typologie repose sur un polymorphisme des chaînes lourdes de la myosine (MHC = Myosin Heavy Chain). En effet, la myosine, qui représente environ 50 % des protéines myofibrillaires, est une molécule de grande taille composée de 2 chaînes lourdes (200 kDa) et de 4 chaînes légères (de 15 à 30 kDa) (figure 1). C'est au niveau des chaînes lourdes que se trouve l'activité ATPasique de la molécule, qui fournit l'énergie nécessaire à la contraction. Jusqu'à présent 10 isoformes différentes de MHC ont été identifiées (Pette et Staron 1990), les principales sont MHC I, IIA et IIB contenues respectivement dans les fibres classées I, IIA et IIB (tableau 1).

Les techniques utilisées classiquement dans les différentes espèces pour le typage des fibres reposent sur des méthodes histo-chimiques appliquées sur coupes de muscles. Elles sont basées sur l'inhibition sélective de l'activité ATPasique myofibrillaire située au niveau des têtes des chaînes lourdes de myosine (type contractile lent/rapide) (Brooke et Kaiser 1970) et/ou sur la corrélation de l'activité d'une enzyme du métabolisme énergétique, la succinate déshydrogénase (type métabolique oxydatif/glycolytique) (Peter *et al* 1972). L'emploi de ces techniques est long et fastidieux, et donne des résultats plus ou moins difficiles à interpréter. La possibilité d'obtenir des anticorps spécifiques de différents types de chaînes lourdes de myosine a été démontrée dans plusieurs espèces. Ces anticorps peuvent être utilisés en immunohisto-chimie sur coupes, en substitution des méthodes d'histochimie, mais, surtout, ils peuvent être employés dans d'autres techniques telles que le Western-blot et le dosage ELISA.

## Résumé

Des anticorps monoclonaux dirigés contre les chaînes lourdes de myosine (MHC : myosin heavy chain) de différentes espèces d'animaux : bovin, porc, poisson, poulet, dinde, cheval ont été produits. Ils ont été testés par immunohistologie sur des coupes de muscle squelettique chez le bovin, le porc, le poisson, le poulet et la dinde et par ELISA chez le cheval. Les différents anticorps retenus dans ce projet permettent de nouvelles applications pour l'étude du muscle squelettique. En particulier deux anticorps monoclonaux peuvent être utilisés pour classer par immunohistologie les fibres IIA et IIB : l'un reconnaissant les MHC I et IIB chez le bovin et le cheval et les MHC I, IIB et IIX chez le porc, l'autre reconnaissant les MHC IIA et IIX chez le porc. D'autres anticorps ont permis de révéler une hétérogénéité dans la composition en myosine des fibres des muscles blanc et rouge de poisson, mais également dans la composition en myosine rapide des muscles de poulet et de dinde, sans toutefois permettre dans ces deux espèces une distinction précise des fibres IIA et IIB. De plus, chez la truite arc-en-ciel, un anticorps réagit plus spécifiquement contre les myosines des petites fibres témoins d'une myogénèse *de novo* dans le muscle blanc. Cependant il n'a pas été possible d'obtenir des anticorps spécifiques des fibres IIA et IIB utilisables en particulier en dosage ELISA ; cette obtention demeure un objectif important pour la poursuite des travaux.

**Figure 1.** Schéma d'une molécule de myosine.**Tableau 1.** Caractéristiques contractiles et métaboliques des trois principaux types de fibres musculaires.

Type de fibres	Lentes = I	Rapides	
		IIA	IIB
Chaîne lourde de myosine	I	IIa	IIb
Activité ATPasique	faible	forte	forte
Métabolisme	oxydatif	oxydo-glycolytique	glycolytique

Ce dernier offre l'avantage d'être quantitatif, plus représentatif de l'ensemble du muscle qu'une coupe histologique, et de pouvoir être appliqué sur un grand nombre d'échantillons.

Différents anticorps sont commercialisés, cependant, jusqu'en 1995, aucun anticorps spécifique des isoformes MHC IIa et IIb n'était disponible dans le commerce pour aucune espèce. Aussi, plusieurs équipes INRA se sont associées à la société Biocytex afin de produire des anticorps monoclonaux spécifiques des isoformes de myosine IIa et IIb chez le bovin, le porc, le poisson, le poulet, la dinde et le cheval, dans le cadre d'un projet nommé « Noé ». La démarche suivie ainsi que les résultats obtenus sont décrits dans ce dossier. De plus, les applications possibles sont détaillées pour chacune des espèces concernées.

## Références

- Brooke M.M., Kaiser K., 1970. Muscle fiber type : how many and what kind ? Arch. Neurology, 23, 369-370.
- Peter J.B., Barnard R., Edgerton V.R., Gillespie C.A., Stempel K.E., 1972. Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in guinea pigs and rabbits. Biochem., 11, 2627-2633.
- Pette D., Staron R.S., 1990. Cellular and molecular diversities of mammalian skeletal muscle fibers. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol., 116, 1-76.

C. JURIE,  
J. NÉDELEC\*,  
B. PICARD

INRA Laboratoire  
Croissance  
et Métabolismes des  
Herbivores, Theix,  
63122 Saint-Genès  
Champanelle

\* Biocytex, 140,  
Chemin de l'Armée  
d'Afrique, 13010  
Marseille

## Production des anticorps monoclonaux spécifiques des chaînes lourdes de myosine

Le principe de production des anticorps monoclonaux consiste à extraire la myosine des muscles d'animaux des différentes espèces, à la purifier et à l'injecter à des souris (immunisation) censées fabriquer des anticorps contre la myosine. Lorsqu'une bonne réponse en anticorps est obtenue, les lymphocytes spléniques (cellules de la rate qui produisent des anticorps) sont fusionnés avec des cellules d'une lignée de myélome (immortelles) grâce à l'addition de polyéthylène glycol qui induit la fusion membranaire. Les lymphocytes ayant fusionné avec les cellules de myélome sont repérés en culture sur un milieu sélectif et sont appelés hybridomes. Chaque hybridome est testé pour la production d'anticorps anti-myosine. Si la réponse est positive, la culture est clonée, c'est-à-dire répartie dans des plaques multipuits de telle sorte qu'il n'y ait qu'une cellule par puits,

celle-ci étant à la fois immortelle et productrice d'anticorps (monoclonal) (figure 1).

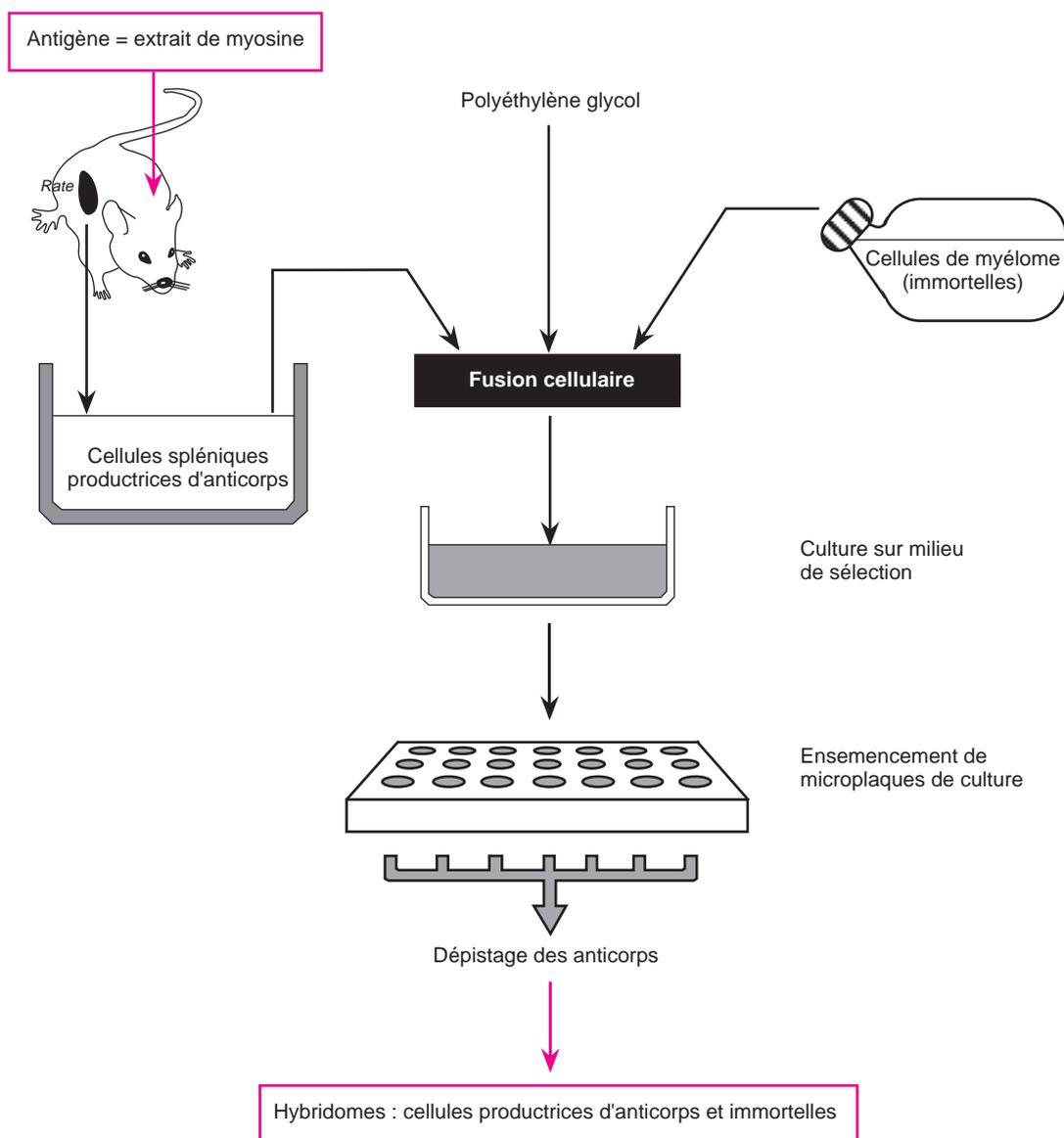
## Protocole expérimental

### Extraction de myosine purifiée

Pour chaque espèce, l'extraction de myosine a été effectuée à partir d'un échantillon de 1 g de muscle, congelé et conservé à - 80 °C. Toutes les étapes de l'extraction ont été réalisées à + 4 °C afin d'inhiber l'action des protéases.

Pour éviter des variations dues aux différentes techniques de purification utilisables, toutes les extractions de myosine purifiée ont été réalisées par la même personne du labora-

Figure 1. Production des anticorps monoclonaux.



toire Croissance et Métabolismes des Herbivores de l'INRA. Au départ, deux techniques ont été testées, une technique utilisant un tampon Guba-Straub classique (Pearson et Young 1989) et une technique décrite par Martone *et al* (1986). Bien que différentes dans la composition de leurs tampons d'extraction, ces deux techniques sont basées sur le même principe, qui repose sur les propriétés chimiques de la myosine, à savoir que celle-ci est soluble à haute force ionique ( $> 0,23$ ), insoluble à faible force ionique et possède la propriété d'hydrolyser l'ATP.

L'échantillon est tout d'abord broyé et homogénéisé dans un tampon de faible force ionique pour extraire les protéines. Après centrifugation, le culot contenant la fraction protéique myofibrillaire est repris dans un tampon de haute force ionique afin de solubiliser la myosine. De l'ATP est ajouté pour dissocier les complexes actine-myosine et donc libérer la myosine. Après une nouvelle cen-

trifugation, permettant entre autres d'éliminer l'actine dans le culot, celle-ci n'étant pas soluble à haute force ionique, le surnageant contenant la myosine est récupéré. La myosine est ensuite précipitée par addition d'EDTA pour la technique de Pearson et Young (1989) ou de  $\text{KHCO}_3$  pour la technique de Martone *et al* (1986), ces deux produits permettant de diminuer ainsi la force ionique. Cette étape s'est révélée la plus importante d'un point de vue quantitatif. En effet, le rendement en myosine avec la précipitation au  $\text{KHCO}_3$  est bien supérieur à celui obtenu avec la précipitation à l'EDTA. La méthode de Martone *et al* (1986) donnant un meilleur rendement et de plus étant plus rapide a été retenue. Ces deux dernières étapes, solubilisation de la myosine et précipitation avec  $\text{KHCO}_3$ , sont réalisées une deuxième fois afin de purifier et de concentrer la myosine. Le culot final, obtenu après centrifugation, est repris avec un tampon de

**Tableau 1.** Caractéristiques des hybridomes retenus par l'ensemble des espèces.

Spécificité	Hybridome	Isotype Immunoglobulines ( $\mu\text{g/ml}$ )	Espèces
anti-myosine totale	S5 7E6	IgG1 $\kappa$ (2,8)	bovin, cheval, porc
anti-MHC I	S4 9G11	IgM $\kappa$ (64)	cheval
	S4 17F7	IgG1 $\kappa$ (6,8)	poulet
	S5 7F10	IgG2b $\kappa$ (140)	dinde
anti-MHC II	S5 15F4	IgG1 $\kappa$ (8)	bovin, cheval
	S4 10G9	IgG1 $\kappa$ (22)	cheval
	S5 14B3	IgG (56) et IgG2b $\kappa$ (6,1)	porc
	S4 8E6	IgG1 $\kappa$ (8)	poisson
	S5 16D12	IgM $\kappa$ (92)	poulet
anti-MHC II mosaïque	S5 8F3	IgG2b $\kappa$ (94)	poulet
	S5 8H2	IgG1 $\kappa$ (22)	dinde
	S5 7D4	IgG1 $\kappa$ (26)	dinde
	S5 11D6	IgG1 $\kappa$ (3,6)	dinde
anti-myosine (mosaïque)	S4 10H9	IgG1 $\kappa$ (31)	poisson
anti-MHC I + IIb	S5 8H2	IgG1 $\kappa$ (22)	bovin, cheval, porc
anti-MHC IIa + IIx	S5 7D4	IgG1 $\kappa$ (26)	porc
anti-MHC IIb	S4 10B6	IgG2b $\kappa$ (0,064)	bovin
	S4 9H5	IgG1 (22) et IgM $\kappa$ (12)	poulet

solubilisation, additionné de glycérol à raison de 50 % et conservé à  $-20^\circ\text{C}$ .

Les extractions de myosine purifiée **en vue de l'immunisation** ont été réalisées sur des échantillons de muscles ne contenant que des isoformes de chaînes lourdes rapides (MHC IIa, MHC IIb) :

- le muscle *cutaneus trunci* pour le bovin et le cheval (bien que ce muscle ne soit pas entièrement rapide chez ce dernier) ;
- le *semitendinosus* pour le porc ;
- le *posterior latissimus dorsi* pour la dinde et le poulet ;
- le muscle blanc de poisson.

De plus, des extractions de myosine purifiée ont été réalisées en vue du tri : le muscle *masseter* (MHC I) pour le bovin, le *pectoralis major* (MHC IIb) pour le poulet et la dinde, le *diaphragma* (MHC I, MHC IIa) pour le cheval.

Afin de vérifier la pureté des myosines obtenues, une électrophorèse en gel de polyacrylamide à 12 % en présence de détergent SDS (Laemmli 1970) a été réalisée pour chacune des espèces. Les résultats obtenus ont montré que l'extraction faite contenait des traces d'autres protéines myofibrillaires (troponine et/ou tropomyosine).

### Immunisation

Six souris (S1 à S6) de la souche BALB/C femelles âgées de six semaines ont été immunisées chacune par 4 injections d'extraits de myosine sur une période de 79 jours. Les immunisations ont été réalisées de la façon suivante : S1 et S2 ont reçu un mélange des extraits de myosine de bovin et de cheval ; S3 et S4 ont reçu un mélange des extraits de myosine de poisson et de dinde ; S5 et S6 ont reçu

un mélange des extraits de myosine de porc et de poulet. Lors des trois premières injections (à J0, J21 et J42) chaque souris a été immunisée avec deux fois  $20\ \mu\text{g}$  de myosine des deux espèces différentes. La première injection (J0) a été réalisée en présence d'adjuvant complet de Freund et les deux injections suivantes (J21 et J42) en présence d'adjuvant incomplet de Freund (l'adjuvant de Freund est une émulsion d'antigène dans l'huile capable d'augmenter non spécifiquement la réponse immunitaire à un antigène ; il contient aussi des *mycobacterium tuberculosis* tuées, l'adjuvant incomplet n'en contient pas). La dernière injection (J79) a été réalisée en intraveineux avec deux fois  $10\ \mu\text{g}$  de myosine en PBS stérile trois jours avant la fusion cellulaire.

Le choix d'immuniser les souris avec deux types de myosine a été dicté par des impératifs d'organisation du travail. Ce choix n'est pas gênant car le système immunitaire des mammifères est habitué à répondre à des stimulations variées et simultanées. La sélection des anticorps spécifiques de chaque myosine est réalisée par la suite : les anticorps sont testés séparément sur chaque myosine ayant servi à l'immunisation. Il est cependant clair que les différentes myosines ont un fort niveau d'homologie dans leur séquence, aussi, certains anticorps monoclonaux produits pourront reconnaître des séquences communes à toutes les myosines.

### Testage des sérums polyclonaux

Des prélèvements sanguins ont été réalisés sur les souris après immunisation à J37 et J57. Les sérums contenant les anticorps ont été testés en ELISA (dosage quantitatif immunoenzymatique) sur les différents ex-

traits de myosine par la société Biocytex. Ils ont également été testés en immunohistochimie sur des coupes de muscles de chaque espèce par le laboratoire Croissance et Métabolismes des Herbivores (INRA).

Les résultats d'ELISA et d'immunohistochimie montrent que les souris S3, S4, S5, S6 ont développé une réponse forte contre les myosines. Quelle que soit l'espèce, leurs sérums contiennent des anticorps capables de reconnaître différents types de MHC. Au vu de l'intensité de la réponse, seuls les lymphocytes des souris S4 et S5 ont été retenus pour réaliser une fusion.

Par contre, les souris S1 et S2, immunisées avec les myosines de cheval et de bovin, ont beaucoup moins bien répondu. Les sérums obtenus n'ont pas permis de distinguer les myosines, ceci dans toutes les espèces, même chez le bovin et le cheval. Ces sérums ne contiennent donc pas d'anticorps capables de reconnaître les MHC. Il a donc été décidé de poursuivre l'immunisation des souris S1 et S2 afin d'augmenter leur réponse à l'antigène. Par la suite, les lymphocytes de la souris S2 ont été fusionnés, mais sans succès.

## Fusion

Les fusions cellulaires ont été réalisées selon le protocole modifié de Köhler et Milstein (1975). Les hybridomes ont été préparés par fusion entre les splénocytes d'une souris immunisée (S4 et S5) et les cellules de myélome X63 Ag8/653 ou celles du myélome SP2/0-Ag14. Les deux types de cellules ont été mélangés selon un rapport 5:1 en présence d'une solution à 40 % de polyéthylène glycol de poids moléculaire 1500 selon le protocole décrit à la figure 1. Les hybridomes (cellules productrices d'anticorps et immortelles) ont été ensuite ensemencés dans des microplaques de culture.

## Testage des surnageants des hybridomes

Le surnageant des puits contenant une seule cellule (clone) visible au microscope a été testé pour la production d'anticorps spécifiques de la myosine par dosage ELISA réalisé par la société Biocytex. De plus, chaque équipe INRA a testé environ 50 hybridomes, les mêmes pour les 6 espèces, issus de la fusion S4 (poisson + dinde) ou S5 (poulet + porc), en ELISA (Picard *et al* 1994) pour l'équipe cheval ou en immunohistologie

pour les équipes bovin, dinde, poisson, porc, poulet.

## Résultats

Les hybridomes testés se répartissent selon 4 groupes :

- des hybridomes qui ne reconnaissent aucune myosine ;
- des hybridomes qui reconnaissent à la fois les myosines rapides et les myosines lentes ;
- des hybridomes qui ne reconnaissent que les myosines rapides, sans distinction entre les fibres de type IIA et les fibres de type IIB ;
- **quelques hybridomes (2 à 3) par espèce qui différencient 2 populations de fibres rapides.**

Chaque équipe a sélectionné 4 hybridomes parmi les plus intéressants. Ils ont été à nouveau testés en immunohistologie sur plusieurs muscles présentant des caractéristiques contractiles différentes, mais également en ELISA, en Western Blot ou en cultures de cellules, selon les espèces. En définitive, seuls les hybridomes dont les caractéristiques sont décrites dans le tableau 1 ont été retenus. L'utilisation possible des anticorps monoclonaux produits par ces hybridomes est détaillée dans les articles ci-après pour chacune des espèces concernées.

## Références

- Köhler G., Milstein C., 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody to predefined specificity. *Nature*, 256, 495-497.
- Laemmli U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Martone C.B., Busconi L., Folco E.J., Trucco R.E., Sanchez J.J., 1986. A simplified myosin preparation from marine fish species. *J. Food Sci.*, 51, 1554-1555.
- Pearson A.M., Young R.B., 1989. 3. Proteins of thick filament. In : B.S. Schweigert and S.L. Taylor (eds), *Muscle and meat biochemistry*. Academic press Inc., San Diego, California.
- Picard B., Léger J., Robelin J., 1994. Quantitative determination of type I MHC in bovine muscle with anti myosin monoclonal antibodies. *Meat Sci.*, 36, 333-343.

B. PICARD,  
M.-P. DURIS,  
C. JURIE

INRA Laboratoire  
Croissance  
et Métabolismes des  
Herbivores, Theix,  
63122 Saint-Genès  
Champanelle

## Caractérisation des chaînes lourdes de myosine dans le muscle de bovin

Les études concernant les qualités organoleptiques de la viande bovine se focalisent sur la tendreté car c'est le critère le plus important pour le consommateur. Parmi les facteurs déterminant cette tendreté, le type de fibres joue un grand rôle. En effet, la vitesse de maturation dépend de la composition en fibres (Valin 1988). Actuellement, la tendreté de la viande présente une grande variabilité qui est la conséquence de la diversité de l'élevage bovin français. Différentes études ont en effet montré que les conditions d'élevage (âge, sexe, race, niveau énergétique et nature de la ration...) modifient la composition en fibres des muscles (Geay et Renand 1994). Aussi, l'objectif des recherches sur la croissance musculaire des bovins est de décrire la mise en place des fibres durant le stade fœtal et de préciser l'influence des différents facteurs sur la composition en fibres des muscles durant la vie post-natale. Ces études nécessitent une méthode fiable pour classer les différents types de fibres. Les techniques d'immunohistochimie, de Western-blot et de dosage ELISA sont couramment utilisées et ont permis d'obtenir des résultats importants (Picard *et al* 1994 et 1995). Cependant, les anticorps disponibles dans le commerce ne permettent pas d'identifier spécifiquement les fibres IIA et IIB. Il apparaît indispensable de disposer d'anticorps pour suivre la différenciation et l'évolution de ces fibres. Cet article fait le point sur les possibilités qu'offrent les anticorps obtenus dans le projet Noé concernant ces applications.

### Caractérisation des anticorps

Les 50 anticorps retenus après un premier tri ont été testés en immunohistologie. Pour cela des coupes sériées transversales de 10 µm d'épaisseur ont été mises en contact pendant 30 minutes avec le premier anticorps (surnageant pur), rincées avec du tampon phosphate, puis incubées pendant 30 minutes avec le second anticorps fluorescent (lapin anti-IgG de souris couplé au FITC, Jackson Immuno-tech) dilué au 1/30 dans du tampon phosphate. Les coupes ont été lavées avec le tampon phosphate et montées entre lame et lamelle avec du mowiol. A l'issue de ce testage sur des échantillons de 3 muscles de bovin adulte (*Cutaneus trunci* : MHC IIA et IIB ; *Diaphragma* : MHC I et IIA ; *Semitendinosus* MHC I, IIA et IIB) et sur le muscle *Longissimus dorsi* de fœtus bovin (âgé de 210 jours), une dizaine d'anticorps a été retenue. Très rapidement, quelques anticorps retestés avaient perdu de leur réactivité et ont été abandonnés. En définitive, 4 anticorps ont été retenus. L'intensité de leur réponse en immunohistologie est décrite dans le tableau 1.

Les 2 anticorps monoclonaux S5 8H2 et S5 15F4 ont également été testés en Western, en ELISA et en culture de cellules. Leur réponse suite à ces différentes techniques est positive et cohérente avec la réponse obtenue en immunohistologie.

**S5 8H2** est un très bon anticorps tant pour l'intensité de la réponse que pour l'informa-

**Tableau 1.** Réactivité des anticorps monoclonaux anti-chaîne lourde de myosine avec les différents types de fibres (I, IIA, IIB) dans le muscle de bovin. L'intensité de la réponse est notée : +++ très forte ; ++ forte ; + faible ; - négative ; ? non testé.

Anticorps	S5 8H2	S5 15F4	S4 10B6	S5 7E6
Muscle de bovin adulte				
<i>Cutaneus trunci</i>				
IIA	-	+++	-	+
IIB	+++	+++	++	+
<i>Diaphragma</i>				
I	+++	-	-	+
IIA	-	+++	-	+
<i>Semitendinosus</i>				
I	++	-	-	+
IIA	-	+++	-	+
IIB	++	+++	++	+
Muscle de fœtus bovin culard (210 j)				
<i>Longissimus dorsi</i>				
I	++	-	-	?
II	++	++	++	?
Spécificité	<b>anti-I+IIB</b>	<b>anti-II</b>	<b>anti-IIB</b>	<b>anti-myosine</b>

tion qu'il donne. Il est à la fois anti-MHC I et anti-MHC IIb (figure 1). Il permet la classification des fibres I et des fibres IIB et donc des fibres IIA par différence. Il répond ainsi à l'objectif de départ : différencier les fibres IIA et IIB. Il permet la distinction de 2 populations de fibres rapides chez le fœtus dès 260 jours de gestation. Il peut être utilisé en immunohistologie, en Western-blot et en culture de cellules, aussi bien chez le fœtus que chez l'adulte. Par contre, il ne peut pas être utilisé en ELISA bien qu'il donne une réponse, car il n'existe pas de muscle témoin entièrement MHC I + IIb permettant de réaliser une gamme étalon.

**S5 15F4** est un très bon anticorps anti-MHC rapides (MHC IIa et IIb) (figure 1) qui peut être utilisé aussi bien en immunohistologie (chez le fœtus et l'adulte), qu'en ELISA, en Western et également en culture de cellules. De ce point de vue en effet, S5 15F4 est d'un intérêt tout particulier car l'anticorps anti-MHC rapides F113 15F4 commercialisé par Biocytex ne donne aucune réponse en culture. De plus, alors que chez l'adulte ils reconnaissent les mêmes cellules, ces deux anticorps anti-myosines rapides donnent des résultats différents au stade fœtal : S5 15F4 reconnaît des cellules qui jusqu'à présent n'étaient reconnues par aucun autre anticorps.

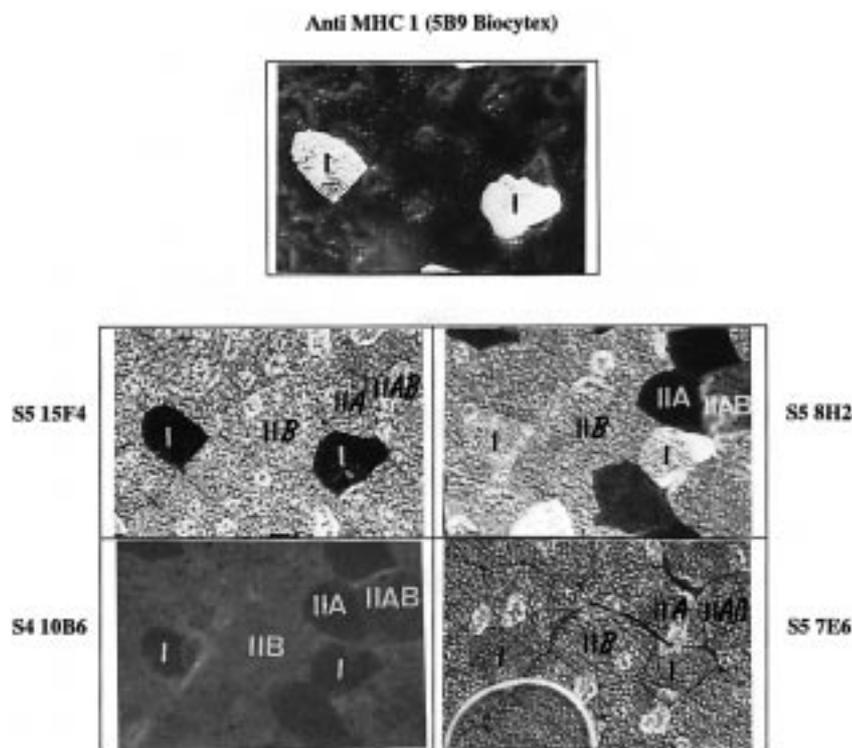
**S4 10B6**, anticorps anti-MHC IIb (figure 1), fait partie des hybridomes qui ont perdu rapidement de leur réactivité, mais qui donnaient lors des premiers essais de très bons résultats en immunohistologie, en ELISA et en culture. En réalité cet hybridome est très peu concentré et mérite d'être reclone.

**S5 7E6** est un anti-myosine totale qui pourrait être utilisé en vue d'un dosage quantitatif de la myosine totale dans différents muscles.

## Conclusion

L'utilisation des anticorps S5 8H2 (anti-I+IIb) et S4 10B6 (anti-IIb) permettra de distinguer les fibres IIA des fibres IIB et donc de préciser les différentes étapes de mise en place de ces fibres musculaires durant la vie fœtale ainsi que leur évolution avec l'âge et sous l'influence des différents facteurs d'élevage. De plus, il a déjà été possible, grâce à l'anticorps S5 8H2 (anti-I+IIb) de mettre en évidence une population importante de fibres hybrides, appelées IIAB, représentant environ 10 % des fibres totales (Picard *et al* 1998). L'étude de ces fibres est un point important pour comprendre comment se produisent les changements de types de fibres. D'autre part, S5 8H2 a également été retenu pour d'autres espèces, en particulier l'espèce porcine. Pour cette espèce il est anti-I+IIb+IIx. Bien que l'isoforme MHC IIx n'ait pas pu être encore identifiée chez le bovin, plusieurs arguments nous amènent à supposer son existence. Selon Hämäläinen et Pette (1995), dans les muscles squelettiques de mammifères, plus la taille de l'animal est importante, plus la concentration

**Figure 1.** Révélation immunohistologique des chaînes lourdes de myosine dans le muscle Semitendinosus de bovin à l'aide des anticorps issus du projet Noé.



de l'isoforme MHC IIx est élevée et inversement pour MHC IIb. De plus, MHC IIx a un épitope commun avec MHC IIb (Schiaffino *et al* 1989), ce qui pourrait expliquer que jusqu'à présent ces deux isoformes aient été confondues et laisse supposer que S5 8H2 serait également anti-I+IIb+IIx chez le bovin avec une proportion très importante de MHC IIx dans les muscles de bovin. Enfin, parmi les différents types de fibres présents à 210 jours de vie fœtale, un type n'était reconnu par aucun anticorps parmi ceux existants jusqu'à présent, ceci dans tous les muscles de bovin culard et dans le *Cutaneus trunci* de bovin non culard (Picard *et al* 1995). Les anticorps **S5 8H2** et **S5 15F4** marquent ces cellules qui ne sont reconnues par aucun autre anticorps ; ils apportent donc une information supplémentaire quant à la caractérisation de ces fibres inconnues.

Les différents anticorps retenus dans ce projet permettent donc de nouvelles applications pour l'étude du muscle de bovin. Cependant l'objectif initial, à savoir l'obtention d'anticorps spécifiques des MHC IIa et IIb utilisables en particulier en dosage ELISA n'a pas été atteint et demeure un besoin important.

## Références

Geay Y., Renand G., 1994. Importance de la variabilité génétique et du mode d'élevage des bovins sur les caractéristiques musculaires et les qualités organoleptiques de leur viande. 1<sup>res</sup> Rencontres Recherches Ruminants, 177-182.

Hamalainen X., Pette X., 1995. Patterns of myosin isoforms in mammalian skeletal muscle fibres. *Microsc. Res. Tech.*, 30, 381-9.

Picard B., Robelin J., Pons F., Geay Y., 1994. Comparison of the foetal development of fibre types in four bovine muscles. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, 15, 473-486.

Picard B., Gagnière H., Robelin J., Pons F., Geay Y., 1995. Presence of an unidentified myosin isoform in certain bovine foetal muscles. *Meat Sci.*, 41, 315-324.

Picard B., Duris M.-P., Jurie C., 1998. Classification of bovine muscle fibers by different histochemical techniques. *Histochem. J.*, à paraître.

Schiaffino S., Gorza L., Satore S., Saggin L., Ausoni S., Vianello M., Gundersen K., Lomo T., 1989 Three myosin heavy chain isoforms in mammalian skeletal muscle. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, 10, 197-205.

Valin C., 1988. Différenciation du tissu musculaire. Conséquences technologiques pour la filière viande. *Reprod. Nutr. Dev.*, 28, 845-856.

L. LEFAUCHEUR,  
P. ECOLAN

INRA Station de  
Recherches Porcines,  
35590 Saint-Gilles

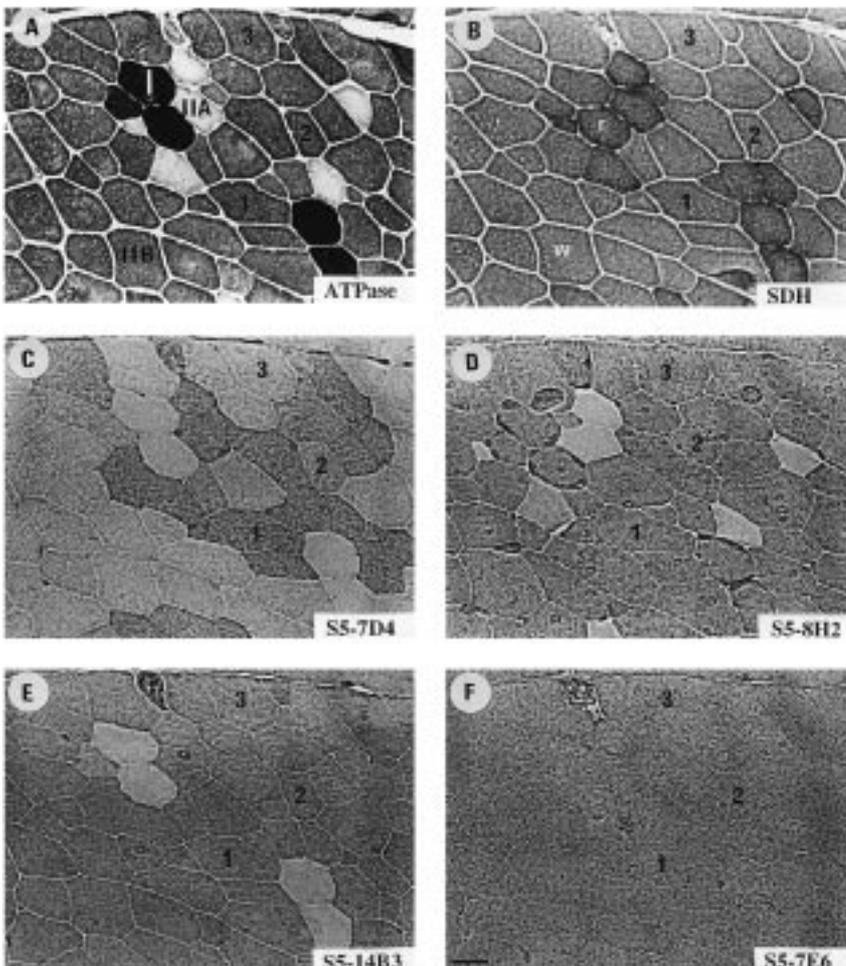
## Composition en chaînes lourdes de myosine des fibres musculaires de type II chez le porc

Les trois types de fibres musculaires classées I, IIA et IIB par les techniques histoenzymatiques existent dans les muscles squelet-

tiques du porc au poids commercial d'abattage (Lefaucheur *et al* 1991). Cette typologie repose sur un polymorphisme des chaînes lourdes de la myosine (MHC) (Schiaffino et Reggiani 1996). Chez diverses espèces de laboratoire, quatre MHC ont été identifiées dans le muscle squelettique adulte : I, IIA, IIX et IIB (Bär et Pette 1989, Schiaffino *et al* 1989, DeNardi *et al* 1993). Ces auteurs ont ainsi montré que les fibres classées IIB lorsqu'elles sont typées par la méthode ATPase constituent une population hétérogène en regard de leur composition en MHC. A notre connaissance, la caractérisation du polymorphisme des MHC de type II n'a pas été réalisée chez le porc, notamment en raison de l'absence d'anticorps spécifiques de chacune des isoformes de MHC. Ce texte rapporte les résultats d'histoimmunologie obtenus avec les anticorps anti-MHC sélectionnés dans le projet Noé.

**Figure 1.** Coupes transversales sériées de muscle longissimus dorsi chez un porc de 100 kg de poids vif.

A) ATPase après préincubation à pH 4,35. B) Révélation de l'activité de la succinodéshydrogénase. C-F) Détection histoimmunologique des MHC à l'aide d'anticorps issus du projet Noé. Les chiffres 1, 2 et 3 repèrent 3 fibres homologues sur les différentes coupes sériées. Barre d'échelle : 50  $\mu$ m.



### Conditions expérimentales

L'étude a été réalisée sur le muscle *longissimus dorsi* (LD) et la partie rouge du muscle *semitendinosus* (STR) chez des porcs femelles de race Large White abattus à 100 kg de poids vif (165 jours d'âge). Les échantillons de muscle ont été prélevés environ 30 minutes après l'abattage, congelés par immersion dans de l'isopentane refroidi par de l'azote liquide et stockés à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'aux analyses histologiques.

Des coupes transversales sériées de  $10\ \mu\text{m}$  d'épaisseur ont été réalisées à l'aide d'un microtome à congélation ( $-20^{\circ}\text{C}$ ). La coloration ATPase après une préincubation de la coupe à pH 4,35 a permis d'identifier les fibres de types I, IIA et IIB (Brooke et Kaiser 1970). L'activité de la succinodéshydrogénase (SDH) est révélée sur une coupe sériée (Nachlas *et al* 1957), elle permet de distinguer des fibres rouges (r), intermédiaires (i) et blanches (w) (figure 1B). Les colorations histoimmunolo-

giques sont réalisées à l'aide d'anticorps monoclonaux anti-MHC issus du projet Noé : S5 7D4, S5 8H2, S5 14B3, et S5 7E6). La liaison des anticorps est visualisée par l'activité peroxydase à l'aide du kit Vectastain ABC (Laboratoires Vector, référence PK 4002).

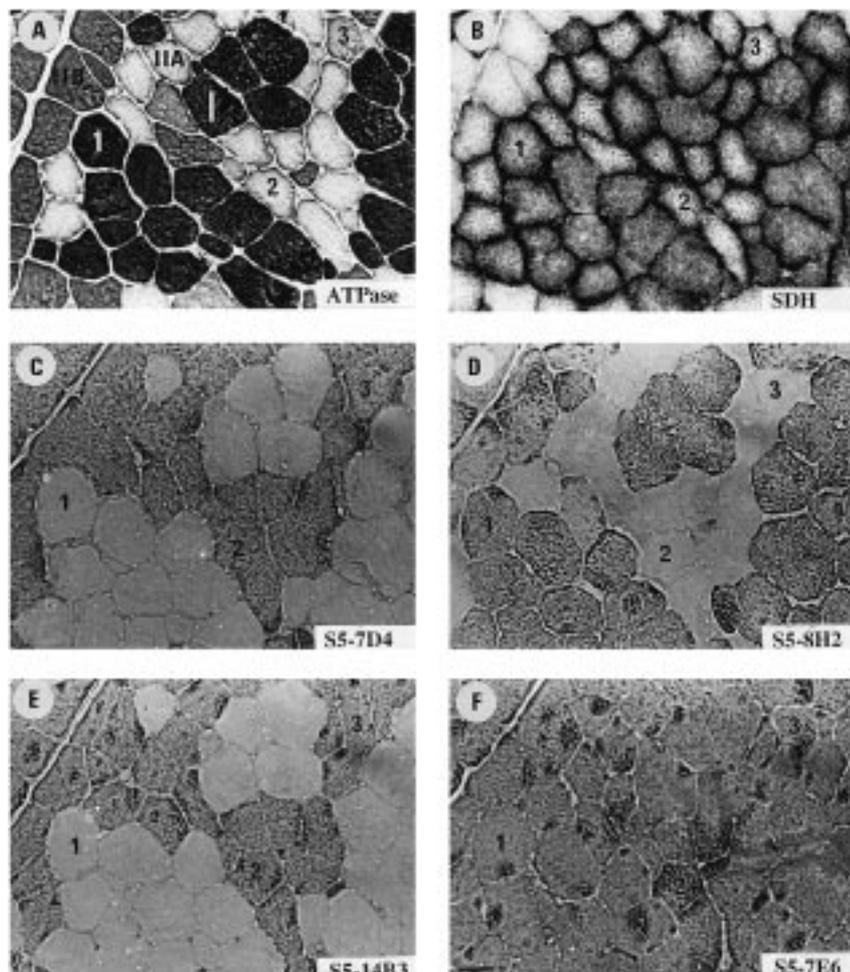
## Résultats et discussion

Dans les 2 muscles étudiés, la coloration ATPasique révèle trois types de fibres : des fibres colorées en noir (type I), en blanc (type IIA) ou en gris (type IIB) (figures 1A et 2A). Les proportions de fibres de type I, IIA et IIB sont respectivement de 10 %, 6 % et 84 % dans le muscle LD, et 40 %, 25 % et 35 % dans le muscle STR. Les fibres de types I et IIA sont toujours riches en SDH (type r). En revanche, les fibres IIB constituent une population hétérogène en regard de la coloration SDH. Dans le muscle LD, environ 12 % des fibres IIB sont de type métabolique intermédiaire (IIBi), et 88 % sont de type blanc (IIBw). Dans le muscle STR, 100 % des fibres IIB sont de type métabolique intermédiaire (IIBi) ou rouge (IIBr).

Dans le muscle LD, l'anticorps S5 7D4 marque fortement les fibres IIA de manière homogène, alors que les fibres IIB présentent un marquage hétérogène (figure 1C). Les fibres IIB les plus marquées par l'anticorps S5 7D4 sont celles qui présentent la plus forte activité SDH, elles sont généralement en contact avec les îlots de fibres I et IIA. La majorité des fibres IIB n'est pas reconnue par l'anticorps S5 7D4, elles sont pauvres en SDH (IIBw) et sont les plus éloignées du centre des îlots de fibres I et IIA. Chez diverses espèces de laboratoire, les fibres initialement classées IIB par la méthode ATPase correspondent en fait à un mélange de fibres contenant des MHC Iix et/ou Iib (Bär et Pette 1989, Schiaffino *et al* 1989, DeNardi *et al* 1993). D'autre part, une diminution de l'activité SDH dans l'ordre  $I > IIA > IIX > IIB$  a été mise en évidence chez ces espèces (Gorza 1990). Nos résultats suggèrent donc que l'anticorps S5 7D4 reconnaît spécifiquement les MHC IIA et Iix porcines, alors que la MHC Iib, probablement présente dans les fibres IIB pauvres en SDH (IIBw), situées à la périphérie des îlots de fibres I-IIA-IIX, n'est pas reconnue. Dans le muscle STR, l'anticorps S5 7D4 marque fortement et de manière homogène les fibres IIA et IIB en ATPase (figure 2C). Ce résultat suggère que l'ensemble des fibres IIB du muscle STR sont en fait de type IIX, en accord avec un métabolisme oxydatif plus élevé que celui des véritables fibres IIB du muscle LD. Cet anticorps ne reconnaît pas les fibres de type I. Des observations réalisées dans le muscle *semitendinosus* chez des fœtus de 75 jours (naissance à 113 jours) suggèrent que l'anticorps S5 7D4 ne reconnaît pas les MHC embryonnaire et fœtale (non montré). En conséquence, l'anticorps S5 7D4 semble spécifique des MHC IIA et Iix et peut être utilisé pour

**Figure 2.** Coupes transversales sériées de muscle *semitendinosus* chez un porc de 100 kg de poids vif.

A-F : *idem* figure 1.



révéler leur présence chez le porc au cours du développement. Cependant, il ne permet pas de distinguer les MHC IIA des Iix.

Dans les 2 muscles étudiés, l'anticorps S5 8H2 marque les fibres de type I et IIB en ATPase, et ne réagit pas avec les fibres de type IIA (figures 1D et 2D). Cet anticorps reconnaît donc les MHC I, Iix et Iib dans le muscle squelettique du porc de 100 kg de poids vif. Il marque l'ensemble des fibres dans le muscle *semitendinosus* chez des fœtus de 75 jours (non montré), suggérant des réactions croisées avec les formes de MHC embryonnaire et/ou fœtale. De ce fait, l'anticorps S5 8H2 peut difficilement être utilisé pour caractériser le polymorphisme des MHC au cours du développement chez le porc. En revanche, il est utile pour identifier les fibres matures qui ne renferment que la MHC IIA (fibres pures IIA).

L'anticorps S5 14B3 marque l'ensemble des fibres de type II en ATPase dans les muscles LD et STR (figures 1E et 2E). Il reconnaît donc les MHC de type IIA, Iix et Iib chez le porc de 100 kg de poids vif. La réaction positive avec l'ensemble des fibres de la seconde génération dans le muscle *semitendinosus* chez le fœtus de 75 jours suggère une réaction

**Tableau 1.** Marquage ou non des différentes fibres par les 4 anticorps anti-MHC dans le muscle squelettique du porc de 100 kg de poids vif.

Anticorps	S5 7D4	S5 8H2	S5 14B3	S5 7E6
Type de fibres				
I	non	oui	non	oui
IIA	oui	non	oui	oui
IIX	oui	oui	oui	oui
IIB	non	oui	oui	oui

croisée avec les formes embryonnaire et/ou fœtale. Cet anticorps peut donc servir à révéler l'ensemble des MHC adultes de type II (IIa+IIx+IIb) après la disparition des formes embryonnaire et fœtale.

L'anticorps S5 7E6 reconnaît toutes les MHC adultes du muscle squelettique du porc (figures 1F et 2F). Il reconnaît également les formes de MHC embryonnaire et/ou fœtale (non montré). Il présente un intérêt en histologie pour visualiser la totalité des fibres musculaires au cours du développement.

## Conclusion

Le tableau 1 récapitule les propriétés des 4 anticorps utilisés. L'anticorps S5 7D4 est particulièrement intéressant. Sa réaction positive homogène avec les fibres IIA et IIB du muscle STR, associée à un marquage négatif d'une sous-population de fibres IIB dans le muscle LD, suggère que cet anticorps reconnaît spécifiquement les MHC IIa et IIx chez le porc, démontrant ainsi l'existence d'au moins 3 isoformes rapides de MHC dans le muscle LD de porc de 100 kg de poids vif. Les trois isoformes rapides n'avaient jusqu'à présent été observées que chez les petites espèces de laboratoires (souris, rat, lapin et cobaye). Mal-

gré les apports du projet Noé, d'autres travaux sont encore nécessaires pour disposer d'anticorps spécifiques de chacune des MHC chez le porc.

## Références

- Bär A., Pette D., 1989. Three fast myosin heavy chains in adult rat skeletal. *Fed. Eur. Biochem. Soc.*, 235, 153-155.
- Brooke M.H., Kaiser K.K., 1970. Muscle fiber types : How many and what kind ? *Arch. Neurol.*, 23, 369-379.
- DeNardi C., Ausoni S., Moretti P., Gorza L., Velleca M., Buckingham M., Schiaffino S., 1993. Type 2X-myosin heavy chain is coded by a muscle fiber type-specific and developmentally regulated gene. *J. Cell Biol.*, 123, 823-825.
- Gorza L., 1990. Identification of a novel type 2 fiber population in mammalian skeletal muscle by combined use of histochemical myosin ATPase and anti-myosin monoclonal antibodies. *J. Histochem. Cytochem.*, 38, 257-265.
- Lefaucheur L., Le Dividich J., Mourot J., Monin G., Ecolan P., Krauss D., 1991. Influence of environmental temperature on growth, muscle and adipose tissue metabolism, and meat quality in swine. *J. Anim. Sci.*, 69, 2844-2854.
- Nachlas N.M., Tsou K.G., DeChang C.S., Seligman A.M., 1957. Cytochemical demonstration of dehydrogenase by the use of a new p-nitrophenol-substituted ditetrazole. *J. Histochem. Cytochem.*, 5, 420-436.
- Schiaffino S., Reggiani C., 1996. Molecular diversity of myofibrillar proteins : Gene regulation and functional significance. *Physiol. Rev.*, 76, 371-423.
- Schiaffino S., Gorza L., Sartore S., Saggin L., Ausoni S., Vianello M., Gundersen K., Lomo T., 1989. Three myosin heavy chain isoforms in type 2 skeletal muscle fibers. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, 10, 197-205.

B. FAUCONNEAU,  
G. PABOEUF

INRA Physiologie  
des Poissons,  
Campus  
de Beaulieu,  
35042 Rennes Cedex

## Etude histoimmunologique de l'expression des chaînes lourdes de myosine dans le muscle squelettique chez la truite arc-en-ciel

Le muscle squelettique de la truite arc-en-ciel est composé de fibres de type lent oxydatif formant le muscle rouge superficiel et de fibres de type rapide glycolytique formant le muscle blanc profond. Ces fibres sont constituées de différents types de myosine (Rowlerson *et al* 1985). A la périphérie du muscle

blanc, des fibres de type intermédiaire rapide oxydo-glycolytique forment un muscle rose en continuum avec le muscle blanc profond (Rowlerson *et al* 1985).

Dans les jeunes stades, le muscle blanc se développe grâce à la persistance d'une myogé-

nèse *de novo* (Stickland 1983) se traduisant par la synthèse régulière de nouvelles fibres musculaires. L'étude de la proportion et de la répartition de fibres immatures au sein du muscle blanc est particulièrement importante pour les recherches sur la croissance du tissu musculaire et sur la qualité de la chair des poissons. Une estimation du processus peut être faite par l'analyse de la distribution de la taille des fibres sur des coupes transversales (Kiessling *et al* 1991, Fauconneau *et al* 1997). La mise en évidence des petites fibres est également possible dans de nombreuses espèces de poissons car elles ont des caractéristiques intermédiaires entre les fibres lentes et les fibres rapides (Rowlerson *et al* 1985). Chez les Salmonidés, ces petites fibres immatures ne se différencient des autres fibres que par leur teneur plus élevée en glycogène (Fauconneau *et al* 1994).

L'objectif de la production d'anticorps anti-chaînes lourdes de myosine est donc de rechercher des isoformes spécifiques exprimées dans les petites fibres du muscle blanc. L'existence d'un anticorps spécifique permettrait d'envisager l'analyse, notamment par des tests de type ELISA, du pourcentage de petites fibres, afin d'étudier le mécanisme de myogénèse *de novo*, et aussi de mieux maîtriser les caractéristiques du tissu musculaire chez les Salmonidés.

## Conditions expérimentales

Les poissons utilisés sont des truites arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) juvéniles de 2 à 4 g élevées à 11 °C dans les structures expérimentales de l'INRA (circuit en eau recyclée, INRA Rennes).

Pour les études histologiques, une tranche complète de la musculature squelettique est prélevée dans la partie caudale (entre la nageoire adipeuse et la nageoire anale). Ces échantillons sont fixés dans un mélange éthanol 70° / glycine 0,05M, pH 2, puis déshydratés et inclus dans de la paraffine. Des coupes transversales de 15 µm sont réalisées.

Pour les études *in vitro*, les muscles squelettiques dorsaux sont prélevés dans des conditions stériles et les cellules satellites sont extraites et mises en culture (Rescan *et al* 1994). Les cellules sont cultivées en présence de sérum de veau fœtal 10 % pendant 8 jours jusqu'à confluence et fusion en myotubes. Les myotubes sont fixés dans un mélange éthanol 70° / glycine 0,05 M, pH 2 puis stockés au froid (- 20 °C) jusqu'à analyse.

Les coupes sont déparaffinées et réhydratées alors que les myotubes sont utilisés directement. Les échantillons sur lames sont rincés dans du tampon phosphate de sodium 0,01M pH 7,4 ; traités par la saponine (0,2 % dans le tampon phosphate) et saturés par de l'albumine sérique bovine (0,2 % dans du tampon phosphate 0,01M pH 7,4). Les coupes sont ensuite mises en contact du premier anticorps

(surnageant pur ou dilué au 1/10) pendant une heure, rincées avec du tampon phosphate puis mises en contact avec le second anticorps fluorescent (anticorps anti-IgG souris couplé au FITC TEBU M30001) dilué au 1/100 dans du tampon phosphate pendant une heure. Les coupes sont lavées ensuite avec le tampon phosphate et montées entre lame et lamelle avec du mowiol.

Soixante-quinze anticorps ont été testés : 15 de la série 2 (S2 : anticorps anti-myosine de bovin et de cheval), 30 de la série 4 (S4 : anticorps anti-myosine de poisson et de dinde) et 30 de la série 5 (S5 : anticorps anti-myosine de porc et de poulet). Les réactions sur les fibres ont été classées sur une échelle de 0 à 4 pour les fibres du muscle rouge (zone extérieure et intérieure), du muscle intermédiaire et du muscle blanc (petites fibres, périphérie, pointes et intérieur des grandes fibres).

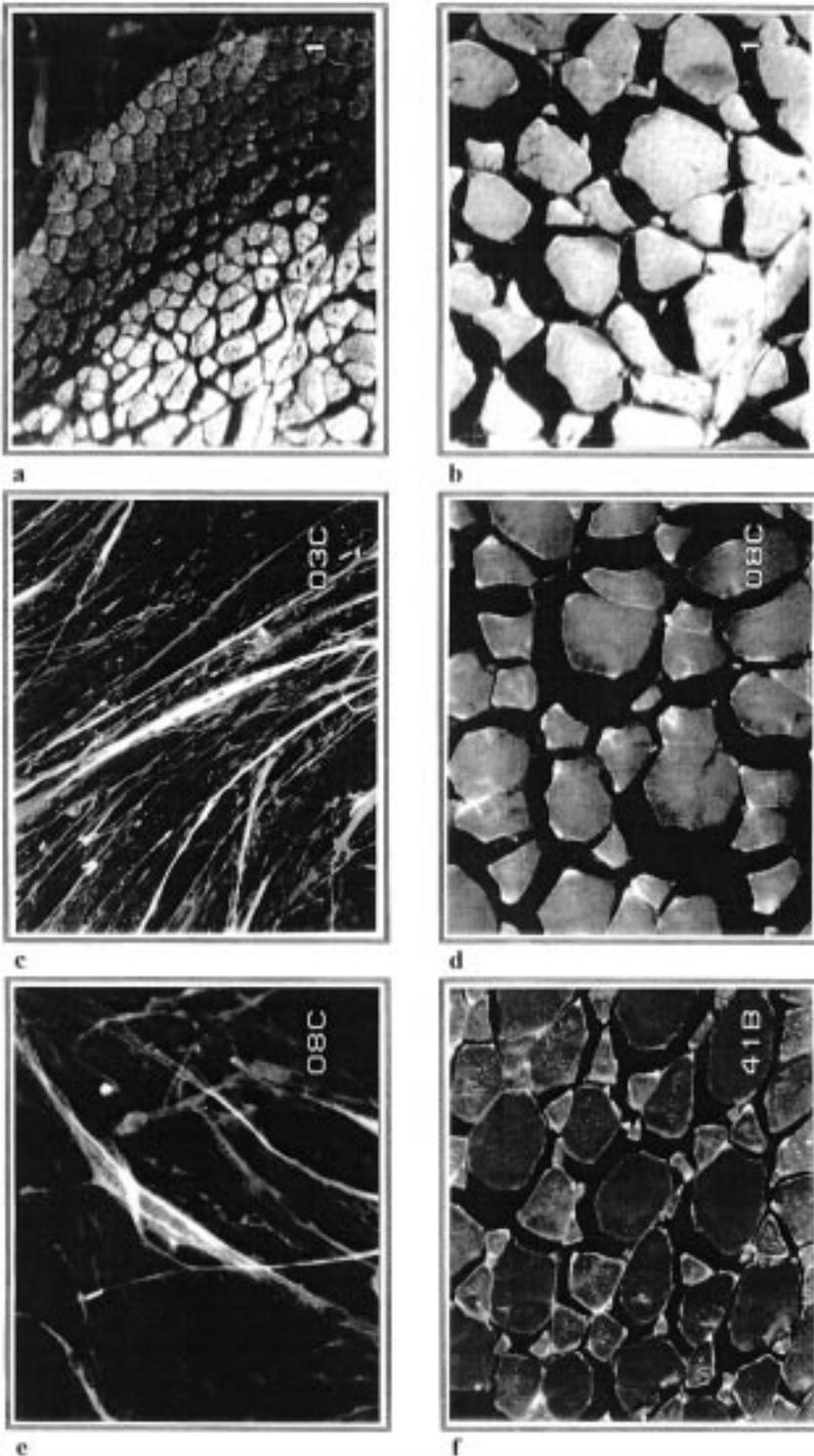
## Principaux résultats obtenus

Les anticorps issus de l'immunisation contre les myosines de bovin et de cheval (S2) réagissent pour la plupart à la périphérie des fibres. Certains anticorps issus des immunisations contre les myosines de porc et de poulet (S5) réagissent de manière non spécifique contre l'ensemble des fibres musculaires des muscles rouge, intermédiaire et blanc (ex : S5 11B4, S5 7D4). Il s'agit souvent d'anticorps réagissant contre les fibres de type I et II dans d'autres espèces.

Les anticorps issus des immunisations contre les myosines de truite et dinde (S4) donnent des réactions plus spécifiques des fibres de type rapide (S4 9C4, S4 10E6, S4 8E6). Certains de ces anticorps (ex : S4 8E6) réagissent de manière homogène dans l'ensemble des fibres rapides des muscles intermédiaire et blanc (figures 1a et 1b) et dans l'ensemble les myotubes des cellules satellites de muscle blanc en culture (figure 1c). Ces anticorps réagissent également faiblement sur des fibres périphériques du muscle rouge et de manière complémentaire à la réponse d'un anticorps monoclonal anti-myosine lente du poulet (S59 ; Crow et Stockdale 1986). Il semblerait donc exister un gradient d'expression de myosine dans le muscle rouge, ce qui constitue un résultat original, observé jusqu'alors dans la composition en chaînes légères du muscle rouge (Fauconneau *et al* 1994).

Des anticorps également issus de la série 4 (S4 10H9 et S4 10H2) sont spécifiques en test ELISA des myosines de truite et spécifiques en Western des chaînes lourdes de myosine. Ces anticorps révèlent positivement les petites fibres et également plus faiblement la pointe des grandes fibres au sein du muscle blanc (figure 1d). Il s'agit de la première démonstration d'une hétérogénéité dans l'expression des isoformes de myosine dans le muscle blanc chez les Salmonidés. Cet anticorps ne révèle que quelques rares myotubes *in vitro* (figure 1e).

**Figure 1.** Révélation des chaînes lourdes de myosine dans le muscle squelettique de la truite arc-en-ciel (1a, 1b, 1d, 1f) et les myotubes issus de cellules satellites de muscle blanc de truite arc en ciel (1c, 1e). Les anticorps testés sont des surnageants purs : S4 8E6 (1a, 1b, 1c), S4 10H9 (1d, 1e), S5 10H6 (1f).



Enfin un anticorps issu de la série 5 et réagissant en ELISA et en Western contre les chaînes lourdes de myosine donne une réponse de type mosaïque, différente de celle décrite précédemment. Les fibres de taille intermédiaire et les petites fibres réagissent fortement à la périphérie et faiblement au centre, alors qu'aucune révélation n'est observée dans les grandes fibres (figure 1f).

L'emploi de différents anticorps semble donc mettre en évidence une hétérogénéité très forte jamais suspectée jusqu'à présent dans les muscles squelettiques blanc et rouge des poissons. Certains anticorps sont des candidats intéressants comme marqueurs des petites fibres dans le muscle blanc, qui permettront l'étude ultérieure de la croissance de type hyperplasique dans le muscle.

## Références

- Crow M.T., Stockdale F.E., 1986. Myosin expression and specialization amongst the earliest muscle fibres of the developing avian limb. *Dev. Biol.*, 113, 238-254.
- Fauconneau B., Bonnet S., Douirin C., Guilbert C. de, Lefevre F., Laroche M., Bauvineau C., 1994. Assessment of muscle biochemical and histochemical criteria for flesh quality in salmonids. In : P. Kestomont *et al* (eds), *Measures for success*, 225-238. Cemagref, Paris.
- Fauconneau B., Andre S., Chmaitilly J., Le Bail P.Y., Krieg F., Kaushik S.J., 1997. Control of skeletal muscle fibres and adipose cells size in the flesh of rainbow trout. *J. Fish Biol.*, 50, 296-314.
- Kiessling A., Storebakken T., Asgaard T., Kiessling K., 1991. Changes in structure and function of the epaxial muscle of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in relation to ration and age. I. Growth dynamics. *Aquaculture*, 93, 335-356.
- Rowlerson A., Scapolo P.A., Mascarello F., Carpena E., Veggetti A., 1985. Comparative study of myosins present in the lateral muscle of some fish : species variations in myosin isoforms and their distribution in red, pink and white muscle. *J. Musc. Res. Cell Motil.*, 6, 601-640.
- Stickland N.C., 1983. Growth and development of muscle fibres in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Anat.*, 137, 323-333.
- Rescan P.Y., Paboeuf G., Fauconneau B., 1995. Myosatellite cells of *Oncorhynchus mykiss* : culture and myogenesis on laminin substrates. In : *Biology of protozoa, invertebrates and fishes. In vitro experimental models and applications. Actes Colloques 18*, 63-68. Ifremer.

## Recherche d'anticorps dirigés contre les différents types de fibres chez le poulet

H. RÉMIGNON\*,  
V. DESROSIERS

INRA Station de  
Recherches Avicoles  
37380 Nouzilly.

\* Adresse actuelle □  
Ecole Nationale  
Supérieure  
Agronomique  
de Toulouse, BP 107,  
31326 Castanet-  
Tolosan Cedex

Chez les oiseaux domestiques, les muscles que l'on trouve dans la cuisse et les pattes sont généralement décrits comme étant de type lent oxydatif. Au contraire, les muscles pectoraux (muscles du filet) sont de typologie variable. Ils présentent une typologie myofibrillaire mixte (oxydo-glycolytique ou IIA, et glycolytique ou IIB) chez les palmipèdes et les oiseaux qui volent, et un caractère complètement glycolytique (fibres musculaires 100 % IIB) chez la dinde et le poulet.

On connaît par ailleurs les liens qui peuvent exister entre la typologie des fibres musculaires et la qualité de la viande en général. Ainsi, dans les muscles présentant différents types de fibres dans des proportions variables, la présence d'une majorité de fibres de tel ou tel type a un effet sur les caractéristiques organoleptiques et technologiques de la viande. Des études récentes ont par ailleurs montré que des facteurs comme la vitesse de croissance, l'âge à l'abattage, ou la conformation des carcasses (augmentation du rendement en muscles pectoraux) pouvaient modifier la typologie des fibres dans certains muscles. D'autres facteurs génétiques, comme une plus ou moins grande susceptibilité au stress, peuvent aussi entraîner des modifications de la typologie des muscles.

Dès lors, il paraît intéressant de mieux comprendre comment les types de fibres musculaires se mettent en place chez l'embryon d'oiseau et de voir comment on pourrait maîtriser ce facteur, notamment à l'aide de la génétique. Pour cela, il semble indispensable de posséder des outils de typologie fiables et facilement utilisables en grande série. L'obtention d'anticorps spécifiquement orientés vers des types particuliers de fibres permettrait d'envisager une telle approche, notamment au travers de biopsies exploitées en immuno-histologie (simplification des techniques actuelles en coupes sériées) ou avec des méthodes ELISA.

### Mode opératoire

Les muscles sélectionnés (3 au total) ont été prélevés après anesthésie et sacrifice d'un poulet standard adulte (20 semaines). Les deux muscles retenus avaient les caractéristiques suivantes (en histologie classique) :

*Posterior latissimus dorsi* (PLD) : fibres IIA et IIB ;

*Pectoralis major* (PM) : fibres IIB.

De plus le muscle *sartorius* (SART, fibres I, IIA et IIB) a été conservé pour l'analyse histologique.

Nous avons testé 70 anticorps issus des séries S4 (poisson + dinde), S5 (poulet + porc) et S2 (bovin + cheval).

L'ensemble des observations a été fait sur des coupes congelées (7 µm d'épaisseur). Après un rinçage rapide dans du PBS, la coupe est mise à incuber pendant 10 minutes à température ambiante en présence de sérum normal (4 % dans du PBS) afin de bloquer les sites non spécifiques. Les coupes sont ensuite mises à incuber (chambre humide à + 4 °C) pendant une nuit en présence du surnageant à tester. Après deux rinçages dans du PBS, l'anticorps secondaire (FITC) est appliqué pendant une heure à température ambiante, puis les coupes sont rincées abondamment au PBS et montées en milieu aqueux. L'observation au microscope est réalisée immédiatement afin de réduire d'éventuels problèmes issus de l'extinction naturelle de la fluorescence.

### Résultats de la première production d'anticorps

Dans un premier temps 5 groupes ont été constitués selon l'efficacité de marquage des différents anticorps sur les muscles PLD, PM et SART des poulets adultes (tableau 1).

Nous avons également testé, dans les mêmes conditions, des anticorps produits par l'équipe de Schiaffino, ce testage s'est avéré de peu d'intérêt chez l'espèce poulet.

Parmi tous les anticorps, 7 ont été retenus (S5 10H5, S5 12D1, S5 16D12, S5 8F3, S4 14B12, S4 9H5 ET S4 17F7) qui paraissaient avoir un intérêt plus particulier. Ils ont donc été testés une nouvelle fois à des dilutions plus importantes (1/10, 1/100 et 1/1000) afin de s'assurer de leur spécificité. Ces résultats obtenus en histologie ont été confrontés à ceux obtenus par la technique du Western-blot par la société Biocytex. Les résultats sont présentés dans le tableau 2.

Pour trois anticorps, il y a une différence nette entre les résultats des deux techniques. En effet, l'anticorps S4 9H5, par exemple, marque les fibres de type IIB en immunohis-

Tableau 1. Résultats du testage des anticorps sur les muscles de poulets.

Groupe	Marquage	Proportion d'anticorps
G1	Pas de marquage	19 / 70 soit 27 %
G2	Marquage de toutes les fibres rapides	36 / 70 soit 51 %
G3	Marquage de toutes les fibres	9 / 70 soit 13 %
G4	Marquage non homogène (mosaïque)	5 / 70 soit 7 %
G5	Marquage du tissu conjonctif	1 / 70 soit 1 %

**Tableau 2.** Confrontation des résultats de spécificité de certains anticorps en fonction de la technique d'identification des types de fibres utilisée.

Anticorps	Histologie <sup>(1)</sup>	Western-blot <sup>(2)</sup>	Observations
S4 9H5	IIB	-	Non concordance Western - histologie
S4 14B12	Anti-rapide	+	Anticorps anti-fibre rapide
S4 17F7	Anti-lent	-	Anticorps anti-fibre lente
S5 8F3	IIA et quelques IIB	-	Non concordance Western - histologie
S5 10H5	Anti-rapide	-	Non concordance Western - histologie
S5 12D1	Anti-rapide	+	Anticorps anti-fibre rapide
S5 16D12	Anti-rapide	+	Anticorps anti-fibre rapide

<sup>(1)</sup> - = Négatif : absence de marquage ; + = Positif : présence de marquage.

<sup>(2)</sup> Test effectué sur le muscle *posterior latissimus dorsi* (PLD).

tologie mais donne un résultat négatif lors du testage en Western-blot. Or le muscle PLD, qui a été utilisé en Western-blot, est toujours décrit comme contenant des fibres de type IIA et IIB chez le poulet. Le même type de remarque peut être fait pour les anticorps S5 8F3 et S5 10H5. Ces écarts peuvent être expliqués par une éventuelle modification structurale de la myosine au cours de son extraction chimique ou de l'électrophorèse séparative.

Par la suite, seuls les anticorps suivants ont été retenus car ils présentaient un réel intérêt en immunohistologie et en Western-blot :

**S4 17F7** anti-fibre I  
**S5 16D12** anti-fibre rapide  
**S5 8F3** anti-fibre IIA (et certaines IIB)  
**S4 9H5** anti-fibre IIB.

## Résultats de la deuxième production d'anticorps

Ces 4 anticorps ont fait l'objet d'une nouvelle production que nous avons testée dans des conditions identiques à celles présentées précédemment. Les résultats ont été quelque peu modifiés par rapport aux précédents car le marquage des fibres I (S4 17F7) a beaucoup faibli en intensité et ceux des anticorps S5 16D12 et S5 8F3 ont disparu. Par contre le marquage anti-IIB du S4 9H5 a persisté correctement. Pour essayer de corriger ces écarts de révélation, les nouvelles productions d'anticorps ont été utilisées à des dilutions plus faibles (1/10 et 1/100) et avec des systèmes de révélation différents (Kit LSAB de Dako, Kit Vectastain de Vector Laboratories). Mais les résultats n'ont pas été améliorés et seuls les anticorps S4 17F7 (anti-I) et S4 9H5 (anti-IIB) ont été retenus pour de nouveaux tests. Ces tests supplémentaires ont été effectués sur des individus et des muscles différents de ceux utilisés précédemment, mais dans les mêmes conditions que lors du criblage primaire (utilisation de l'anticorps dilué au 1/1000 et révélation par le FITC (Sigma) au 1/500). Les muscles utilisés chez les différents animaux étaient le *posterior latissimus dorsi* (PLD, fibres IIA et IIB), le *pectoralis major* (PM, fibres IIB), le *sartorius* (SART) et l'adducteur profond (AP) qui contiennent tous les

deux des fibres I, IIA et IIB. Les animaux utilisés étaient tous issus de la même souche et ont été testés aux âges de 1 (n=4), 3 (n=4), 6 (n=4) 12 (n=4) et 20 (n=3) semaines.

Chez l'ensemble de ces individus, l'anticorps **S4 17F7** (anti-I) fonctionne correctement dans l'ensemble des muscles où des fibres lentes sont présentes. On note cependant une intensité de marquage plus ou moins forte suivant les âges, le marquage paraissant plus intense à partir de 3 semaines.

Pour l'anticorps **S4 9H5** (anti-IIB), les résultats sont beaucoup moins facilement interprétables. Ainsi, on obtient 100 % de marquage correct chez 2 individus sur 3 à l'âge de 20 semaines et simplement 83 % de marquage correct chez le troisième. Dans ce dernier cas, 17 % des fibres identifiées comme étant IIB en histologie classique ne sont pas reconnues par l'anticorps. La proportion de fibres correctement marquées varie ensuite beaucoup selon l'âge, mais se situe toujours autour de 60 à 70 %. Ces chiffres sont en fait le résultat des moyennes calculées sur tous les individus d'un même âge pour les muscles PLD, SART et AP. De plus, chez certains individus, l'efficacité du marquage pour cet anticorps varie en fait de 75 % à 100 % (pour des champs différents pris dans le même muscle) dans le muscle SART à 3 semaines et dans le PLD à 6 semaines.

Dans le muscle PM, au contraire, le marquage des fibres est totalement efficace, sauf à l'âge de 1 semaine où l'efficacité est voisine de 85 %. Cette hétérogénéité est aussi constatée dans les autres muscles ; elle est probablement due à un typage non homogène des fibres IIB à cet âge.

## Conclusion

De façon générale, on ne peut pas retenir une complète spécificité de marquage de l'anticorps S4 9H5 et ce d'un âge ou d'un muscle à l'autre.

Il faut en conclure que :

- soit l'anticorps reconnaît un épitope qui n'est pas représenté à 100 % dans toutes les fibres IIB de tous les poulets testés, c'est-à-dire que l'anticorps reconnaît une sous-classe

de fibres particulières que l'on ne distingue pas des IIB en histologie classique ;

- soit la technique d'identification des fibres IIB (ATPase acide classique) est imparfaite et ne permet pas de systématiquement bien typer les fibres musculaires.

Il est bien difficile de choisir entre ces deux hypothèses car on sait que certaines fibres existent mais ne sont pas détectables en histologie classique (cas des fibres IIX chez le porc). On sait aussi que la typologie myofibrillaire est dans un état dynamique (avec des possibili-

tés de passage d'un type à l'autre) et qu'il peut donc aussi y avoir des fibres dans un état intermédiaire de façon transitoire et normale.

Quoiqu'il en soit, il paraît impossible d'essayer d'utiliser ces anticorps aujourd'hui en substitution des techniques ATPasiques classiques. De plus la perte totale de réactivité des anticorps S5 16D12, S5 8F3 et la diminution apparente de l'affinité du S4 17F7 sont encore un point d'interrogation supplémentaire sur leur spécificité réelle pour les types de fibres initialement identifiées.

## Anticorps anti-chaînes lourdes de myosine : outils d'étude de la régénération musculaire dans l'espèce dinde

Y. CHEREL,  
L. GUIGAND,  
M. WYERS

La production de dindes de souche médium-alourdie (mâles de 16 semaines abattus à 12 kg environ et femelles de 12 semaines abattues à 7 kg) fournit des carcasses utilisées en découpe. Les produits issus de cette découpe ont des valeurs commerciales différentes : les pectoraux procurent une viande blanche (correspondant à des muscles rapides) transformée en escalopes ou rôtis, c'est la partie noble ; les cuisses et, dans une moindre mesure, les ailes sont composées de viande rouge, correspondant à des muscles mixtes rapides et lents. Ils sont à l'origine de steak, osso bucco et blanquette. Actuellement, la transformation de la viande pour fournir des produits de charcuterie est encore peu développée, même si cette transformation semble représenter un débouché d'avenir.

Les notions de qualité de la viande de dinde se résument aujourd'hui à deux problématiques différentes : la première concerne la couleur des muscles blancs (hétérogénéité de couleur ainsi que grisaillement) c'est-à-dire quasi-exclusivement les muscles pectoraux ; la seconde a trait à l'exsudation des viandes après transformation. Or, les muscles pectoraux sont des muscles homogènes rapides, formés presque totalement de fibres de type IIB. La production d'anticorps permettant de discriminer les chaînes lourdes de myosine (MHC) des types IIa et IIb dans le but de typer les fibres musculaires n'a donc pas, dans l'espèce dinde, l'intérêt qu'elle peut avoir en termes de qualité des viandes et de sélection dans d'autres espèces.

En revanche, cette production d'anticorps présente un intérêt en tant qu'outil d'étude de la biologie du tissu musculaire. En effet, pour l'étude de la croissance du tissu musculaire

aussi bien que pour l'étude de sa régénération après lésion, l'expression des isoformes de myosine est un excellent marqueur de la différenciation cellulaire.

Au cours de la croissance, les fibres musculaires multinucléées fusionnent avec des myoblastes issus de la prolifération de cellules satellites. Le nombre de noyaux des fibres croît, ce qui permet, par l'intermédiaire des synthèses de myofilaments, d'augmenter la taille de la cellule, car le rapport nucléocytoplasmique est constant dans un type de fibre donné.

Après lésion de la fibre musculaire, les zones nécrosées sont éliminées par phagocytose macrophagique, puis les cellules satellites fournissent les myoblastes qui fusionnent avec la fibre blessée ou fusionnent entre eux pour fournir des néo-myotubes.

Après la fusion, ces néo-myotubes ou certaines portions de fibres matures synthétisent les protéines contractiles avec une succession d'isoformes qui reproduit le décours temporel observé pendant le développement embryonnaire. La mise en évidence de ces isoformes est un moyen d'étude de la différenciation cellulaire et de l'action de facteurs modulant le développement du tissu.

Nous utilisons au laboratoire, en immunofluorescence ou en immunohistoenzymologie, plusieurs anticorps anti-isomyosines développementales dans le cadre de travaux sur la régénération musculaire, et en immunocytochimie sur culture de cellules satellites pour caractériser les populations de cellules. La possession d'anticorps anti-MHC IIa et IIb complèterait de façon très intéressante la gamme existante.

INRA URA 703  
Développement et  
Pathologie du tissu  
musculaire,  
École Nationale  
Vétérinaire,  
BP 40706,  
44307 Nantes  
Cedex 03

## Conditions expérimentales

Les anticorps monoclonaux anti-MHC produits dans le cadre du projet Noé ont tous été testés sur différents muscles de dinde par immunofluorescence : les coupes réalisées au cryostat ont été fixées à l'acétone à 4 °C pendant 30 minutes puis incubées avec l'anticorps primaire dilué au 1/10 et 2 % de BSA pendant 1 heure à 37 °C puis lavés dans du PBS pH 7,2. Les coupes ont ensuite été incubées à la température de la pièce avec l'anticorps secondaire lié au FITC (Euromedex AP 160F) dilué au 1/100 pendant 1 heure. Lorsque le signal paraissait prometteur, un contrôle à une dilution de l'anticorps primaire à 1/100 a été réalisé.

Afin de fixer avec précision le type de chaque anticorps, chacun d'entre eux a été utilisé sur 4 muscles coupés en congélation : le pectoral (*pectoralis major*), composé presque exclusivement de fibres de type IIB, le PLD (*posterior latissimus dorsi*), composé d'un mélange de fibres de type IIA et IIB, l'ITC (*iliotibialis cranialis*), formé d'une zone hétérogène composée de fibres de type I, IIA et IIB et d'une zone hétérogène composée de fibres de type IIA et IIB, et l'ALD (*anterior latissimus dorsi*), composé de fibres de type III.

## Résultats

Les résultats suivants ont été obtenus :

- 1 anticorps a fourni un marquage très faible des fibres squelettiques mais il marquait très fortement les artères présentes sur la coupe (MHC spécifique de fibre musculaire lisse) ;

- 32 anticorps ont fourni un signal nul ou faible ;

- 1 anticorps un signal très faible sur des fibres de type III (lentes) ;

- 16 anticorps un signal positif sur les fibres de type II, sans les différencier ;

- 5 anticorps pan-myosine (c'est-à-dire couvrant toutes les isoformes de myosine), marquage de toutes les fibres ;

- 3 pan-myosine avec un signal supérieur pour les fibres de type I (lentes) ;

- 3 pan-myosine avec un signal supérieur pour les fibres de type II (rapides) ;

- 3 anticorps ont fourni un signal restreint aux fibres de type II, mais en se fixant de façon plus marquée sur certaines fibres II et beaucoup plus faible sur d'autres fibres II, aboutissant à la formation d'une mosaïque à l'observation des coupes transversales.

Ces trois derniers anticorps, à savoir **S5 8H2**, **S5 7D4** et **S5 11D6**, ainsi que l'anticorps anti-I **S5 7F10** ont été retenus.

L'analyse en Western-blot a montré que deux des anticorps anti-myosine rapide fournissant une mosaïque en immunofluorescence étaient des anticorps anti-II, et que le troisième était un anticorps anti-IIa, mais la mosaïque observée ne correspond pas à une distribution de fibres de type IIA et IIB, des fibres IIB étant positives. On peut interpréter cette distorsion par l'existence de fibres contenant à la fois des isoformes IIA et IIB correspondant à une maturation incomplète.

Les anticorps générés par ce projet constituent des outils utilisables en immunohistochimie. Ils sont en cours de test sur des myotubes issus de la régénération musculaire *in vivo* et sur des myoblastes en culture.

E. BARREY,  
J. P. VALETTE\*,  
M. JOUGLIN\*

INRA Station  
de Génétique  
Quantitative  
et Appliquée,  
78352 Jouy-en-Josas

\* Ecole Nationale  
Vétérinaire d'Alfort,  
Laboratoire  
de Biomécanique,  
94704 Maisons-  
Alfort Cedex

## Analyse de la composition en chaînes lourdes de myosine chez le cheval : application à la sélection du cheval de course

La performance du cheval de course dépend de plusieurs facteurs biologiques interdépendants : la respiration, la circulation sanguine, le métabolisme énergétique, les contractions musculaires, la locomotion et l'aptitude comportementale. Les propriétés contractiles et métaboliques des muscles propulseurs constituent l'un des facteurs limitants qui déterminent la force et l'endurance du cheval à la course (Barrey 1994). La force développée par les contractions musculaires dépend à la fois du nombre total et du type de fibres qui composent le muscle. Chez le cheval, il existe trois

isoformes de la chaîne lourde de la myosine : la myosine lente (MHC I), et deux myosines rapides (MHC IIA et MHC IIB). Les fibres musculaires très riches en isoforme MHC IIB produisent des contractions plus puissantes mais moins durables. Une fibre musculaire peut être composée de plusieurs isoformes de la myosine (I+IIa ou IIa+IIB) et la myosine dominante détermine le type de fibre parmi les types lent (I) ou rapides (IIA, IIB) lorsqu'on les observe en histologie par la méthode de coloration ATPase (Rivero *et al* 1996). Le type de fibre rapide dénommée IIC en histolo-

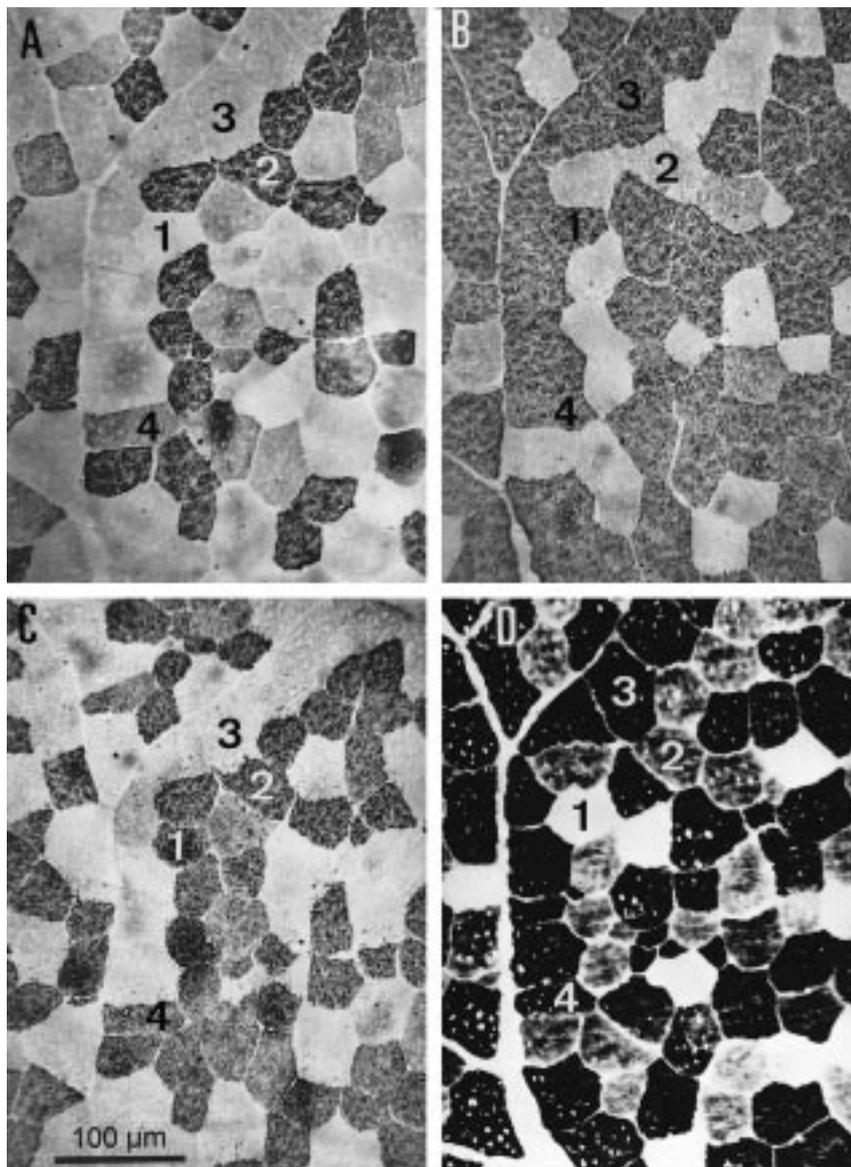
gie correspond en fait à un mélange des isoformes I et IIa de la myosine rapide qui donne une coloration intermédiaire. Contrairement à d'autres mammifères, le cheval adulte ne semble pas avoir de quatrième isoforme IIx de la chaîne lourde de la myosine. Cependant, la myosine MHC IIb du cheval a les mêmes propriétés de migration en électrophorèse que la myosine MHC IIx du rat, ce qui indiquerait qu'il s'agit peut-être de la même isoforme (Rivero *et al* 1996).

Afin de proposer des critères objectifs de sélection précoce des meilleurs chevaux de course, il paraissait intéressant d'estimer la composition en myosine de certains muscles propulseurs de la croupe. La composition en myosine de plusieurs muscles a été étudiée pour choisir un muscle qui soit à la fois représentatif du travail de propulsion en course et facile à prélever de manière standardisée. Le muscle fessier moyen (*gluteus medius*) réunit ces conditions et une étude de morphométrie par échographie a permis de définir deux points de prélèvement standardisés dans les parties dorsale et ventrale du muscle.

Pour envisager des études quantitatives sur des chevaux de valeur, il fallait disposer d'une technique de dosage sur micro prélèvement (10-30 mg) qui soit fiable, productive et peu coûteuse. L'emploi d'un anticorps monoclonal dirigé contre la myosine lente a permis de mettre au point une technique de dosage immunoenzymatique ELISA chez les bovins (Picard *et al* 1994) qui a été adaptée pour le cheval (Barrey *et al* 1995). Par la suite, l'utilisation d'un second anticorps dirigé contre les deux isoformes de la myosine rapide a amélioré la technique de dosage (Valette *et al* 1995).

Une première étude de la composition en myosine du muscle fessier moyen chez les chevaux de race Anglo-Arabe a permis d'établir la relation avec les performances en compétition et d'estimer pour la première fois la composante génétique de ce caractère. Les meilleures performances étaient obtenues en course de galop (course sur un terrain plat d'environ 2 000 m) et en concours de saut d'obstacle (parcours d'obstacles) par des chevaux dont le muscle fessier moyen était plus riche en myosine rapide (Barrey *et al* 1997a). La différence de composition avec les chevaux ayant obtenu de moins bonnes performances était d'environ 6 % dans les deux disciplines. L'héritabilité du pourcentage de myosine rapide dans le muscle fessier moyen (*gluteus medius*) et le muscle de la cuisse (*gluteobiceps femoris*) a été estimée, pour la première fois chez le cheval, à 13 % dans la race Anglo-Arabe, avec toutefois encore une large incertitude sur cette valeur (Erreur standard = 0,10) (Barrey *et al* 1997b). Cette héritabilité semble plutôt faible par rapport à celle dans les autres espèces, car il existe une grande homogénéité de ce caractère musculaire dans cette race qui a déjà été sélectionnée pour la course. Ces premiers résultats ont montré l'intérêt de poursuivre ces travaux dans le but de faire des analyses en routine de la composition en

**Figure 1.** Identification du type de fibre musculaire par immunohistologie (A, B, C) et histoenzymologie (D). Des coupes sériées du muscle latissimus dorsi d'un cheval ont été marquées par 3 anticorps monoclonaux dirigés respectivement contre les isoformes de la chaîne lourde de la myosine : SC 71 anti-MHC IIa (figure 1A), S5 8H2 anti-MHC I+IIb (figure 1B) et BF 35 anti-MHC I+IIa. Pour comparaison, la coloration histologique classique est présentée figure 1D. Elle est basée sur la révélation de l'activité enzymatique des ATPases myofibrillaires après une incubation alcaline à pH 10,4. Les types de fibres identifiés sont les suivants : 1= fibre lente contenant MHC I, 2= fibre rapide à dominante MHC IIa, 3= fibre rapide à dominante MHC IIb, 4=fibre rapide mixte de type IIC qui comprend les myosines MHC IIa+IIb. Ces coupes histologiques ont été obtenues avec la collaboration de J.L. Rivero (Université de Cordoba, Espagne).



myosine pour aider à la sélection précoce des chevaux de course.

La faible variabilité phénotypique et génétique des races de chevaux de course incite à perfectionner la méthode de dosage afin de pouvoir distinguer la composition en deux isoformes de la myosine : MHC IIa et MHC IIb. En effet, les muscles plus riches en myosine IIa ont une meilleure aptitude à se contracter pendant une durée de quelques minutes tandis que ceux qui sont plus riches en myosine IIb peuvent développer des contractions plus

puissantes pendant moins longtemps. Ainsi, le cheval de course (Pur sang) adapté à une distance d'environ 2 000 m aurait des muscles plus riches en MHC IIa, tandis que le sprinter courant sur une courte distance (< 1 000 m) aurait davantage de MHC IIb et le cheval d'endurance (course de marathon de plus de 100 km) aurait une proportion élevée de la somme des myosines MHC I et MHC IIa. Afin de doser ces différentes myosines, il fallait disposer d'anticorps monoclonaux spécifiques et améliorer la technique de dosage ELISA.

### Anticorps monoclonaux dirigés contre les MHC du muscle équin

Tous les anticorps monoclonaux obtenus dans le projet Noé ont été testés dans un premier temps par la méthode ELISA en utilisant des muscles de référence, de composition déterminée préalablement par électrophorèse : *masseter*, *cutaneus trunci*, *diaphragma*, *semi-tendinosus*. Dans un deuxième temps, les anticorps retenus ont été testés par Western-blot, puis utilisés en immunohistologie pour typer les fibres sur des coupes sériées (J.L. Rivero 1997, données non publiées). En plus des anticorps produits par l'INRA, nous avons testé, selon la même procédure, des anticorps anti-MHC IIa (SC 71), MHC IIb (BF F3) et MHC I (BA D5) spécifiques du muscle de rat, issus des travaux de Schiaffino *et al* (1989). Le tableau 1 résume les résultats obtenus avec les anticorps qui présentent un intérêt pour analyser le muscle du cheval. Les anticorps dirigés contre la MHC I sont réactifs chez le cheval, comme dans de nombreuses autres espèces. Par contre, la spécificité anti-MHC IIa de l'anticorps SC 71 semble limitée au rat et au cheval (figure 1). Aucun anticorps anti-MHC IIb n'a été identifié pour le muscle du cheval mais il existe un anticorps (S5 8H2) ayant une double réactivité avec les myosines MHC I et MHC IIb. Ce marquage présente un intérêt pour l'identification des fibres musculaires par immunohistologie d'autant plus qu'il n'existe aucun autre anticorps susceptible de marquer spécifiquement les fibres IIb (figure 1).

### Détermination de la composition en MHC IIa par une technique ELISA

L'anticorps monoclonal anti-MHC IIa (SC 71) nous a permis de perfectionner le dosage ELISA des isoformes de la myosine du muscle *gluteus medius* chez le cheval. De même que pour le dosage des myosines lente et rapide totales, une gamme étalon est établie pour déterminer la relation entre la densité optique du produit coloré final de la réaction immunoenzymologique et le pourcentage de myosine MHC IIa. Deux muscles de référence peuvent être utilisés pour établir cette courbe de calibration : le muscle *gluteus medius* ou le *gluteobiceps* qui a l'avantage d'être plus riche en MHC IIa (environ 60 %). La composition en myosine du muscle de référence est tout d'abord déterminée par électrophorèse (Talmadge et Roy 1993), puis différentes dilutions de la MHC IIa sont dosées par la technique ELISA afin de construire une droite de calibration qui met en relation la proportion en MHC IIa et la densité optique de la réaction immunoenzymatique. Ainsi, trois anticorps monoclonaux permettent de déterminer la composition en chaînes lourdes de la myosine MHC I, IIa et II totale et on en déduit par différence le pourcentage de MHC IIb.

### Conclusion

L'obtention d'anticorps monoclonaux dirigés spécifiquement contre un type de chaîne lourde rapide MHC IIa et MHC IIb du cheval s'est avérée une opération difficile qui a nécessité la mise en œuvre de plusieurs méthodes d'analyse pour s'assurer de la spécificité des anticorps à tester (ELISA, immunohistologie, électrophorèse et Western-blot). Parmi les anticorps obtenus par l'INRA en collaboration avec Biocytex, un seul présente une réelle originalité pour l'espèce équine puisqu'il marque les myosines IIb et I en immunohistologie. D'autres anticorps, moins originaux puisqu'ils étaient déjà disponibles sur le marché, ont une affinité soit pour la

**Tableau 1.** Caractéristiques des anticorps monoclonaux du projet Noé et de Schiaffino *et al* (1989) ayant une affinité pour les isoformes des chaînes lourdes de la myosine chez le cheval.

Anticorps	Origine	Isotype	Immunohistologie	ELISA
S5 8H2	INRA <sup>(1)</sup>	Ig G1 kappa	I+IIb	MHC I+IIb
S5 15F4	INRA	Ig G1 kappa	IIA + IIB	MHC II
S4 10G9	INRA	Ig G1 kappa	IIA + IIB	MHC II
S5 7E6	INRA	Ig G1 kappa	I+IIa+IIB	MHC I+IIa+IIb
S4 9G11	INRA	Ig M kappa	I	MHC I
SC 71	Schiaffino <i>et al</i> 1989 <sup>(2)</sup>	Ig G1 kappa	IIA et hybrides IIC (I+IIA) ou IIAB (IIA+IIB)	MHC IIa
BF F3	Schiaffino <i>et al</i> 1989	Ig M kappa	rien	rien
BA D5	Schiaffino <i>et al</i> 1989	Ig G2 b kappa	I	MHC I

<sup>(1)</sup> Anticorps conservés par Biocytex (Marseille, France).

<sup>(2)</sup> Anticorps conservés et commercialisés par DSM (Braunschweig, Allemagne).

chaîne lourde de la myosine lente (MHC I), soit pour les chaînes lourdes des myosines rapides (MHC II totale). Un anticorps (SC 71) ayant une bonne spécificité pour la chaîne lourde de la myosine rapide de type IIa (MHC IIa) chez le cheval a été identifié parmi les anticorps monoclonaux obtenus par une autre équipe (Schiaffino *et al* 1989). Cet anticorps est utilisable pour les dosages par la technique ELISA et permettra de compléter nos connaissances sur la relation entre le profil musculaire et l'aptitude du cheval de course. Dans l'avenir, l'obtention d'un anticorps complémentaire dirigé contre la chaîne lourde de la myosine IIb permettrait d'améliorer la précision de la technique de dosage ELISA.

## Références

Barrey E., 1994. Propriétés contractiles des fibres musculaires et performance physique chez le cheval. *INRA Prod. Anim.*, 7, 41-53.

Barrey E., Valette J.P., Jouglin M., Picard B., Geay Y., Robelin J., 1995. Enzyme-linked immunosorbent assay for myosin heavy chains in horse. *Reprod. Nutr. Dev.*, 35, 619-628.

Barrey E., Valette J.P., Jouglin M., Blouin C., Langlois B., 1997a. Relationship between the fast myosin heavy chain percentage of the *gluteus medius* muscle and the competitive performance in horses. 48th Annual Meeting of European Association for Animal Production, 25-28 August, Vienna, 156.

Barrey E., Valette J.P., Jouglin M., Blouin C., Langlois B., 1997b. Heritability of fast myosin heavy chain percentage of locomotor muscle in horses. 48th Annual Meeting of European Association for Animal Production, 25-28 August, Vienna, 160.

Picard B., Léger J.O.C., Robelin J., 1994. Quantitative determination of type 1 MHC in bovine muscle with anti-myosine monoclonal antibodies. *Meat Sci.*, 36, 333-343.

Rivero J.L., Talmadge R.J., Edgerton V.R., 1996. Myosin heavy chain isoforms in adult equine skeletal muscle : an immunohistochemical and electrophoretic study. *Anat. Rec.*, 246, 185-194.

Schiaffino S., Gorza L., Sarore S., Saggin L., Ausoni S., Vianello M., Gundersen K., Lomo T., 1989. Three myosin heavy chain isoforms in type 2 skeletal muscle fibres. *J. Muscl. Res. Cell. Motil.*, 10, 197-205.

Talmadge R., Roy R., 1993. Electrophoresis separation of rat skeletal muscle myosin heavy-chain isoforms. *J. Appl. Physiol.*, 75, 2337-2340.

Valette J.P., Barrey E., Jouglin M., 1995. Slow myosin heavy chain content of muscles measured by ELISA. *Equine vet. J., Suppl.* 18, 248-251.

## Abstract

***Production and utilisation of monoclonal antibodies against myosin heavy chain isoforms in different species.***

Monoclonal antibodies specific to myosin heavy chains (MHC) of different species of animals : bovine, pig, fish, chicken, turkey, horse have been produced. They have been tested by immunohistology on sections of skeletal muscle in bovine, pig, fish, chicken and turkey and by ELISA in horse. The different antibodies selected in the project allowed new applications for the study of skeletal muscle. In particular, two monoclonal antibodies can be used to classify by immunohistology the fibres IIA and IIB : one of them recognizing MHC I and IIB in bovine and horse and MHC I, IIB and IIX in pig, the other recognizing MHC IIa and IIX in pig. Some antibodies revealed heterogeneity in the

myosin composition of fibres of white and red fish muscles as in the composition of fast myosin in chicken and turkey muscles without allowing a precise distinction of fibres IIA and IIB in the two species. More, in the rainbow trout, an antibody recognized more specifically the myosins of little fibres markers of the myogenesis *de novo* in the white muscle. However the obtention of specific antibodies against MHC IIa and IIB usable in particular in ELISA has not been achieved and remains an important necessity.

INRA Groupe Noé, Société Biocytex, 1998. Caractérisation des différents types de fibres musculaires dans plusieurs espèces : production et utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre les chaînes lourdes de myosine rapide IIa et IIB. *INRA Prod. Anim.*, 11, 145-163.