

**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).

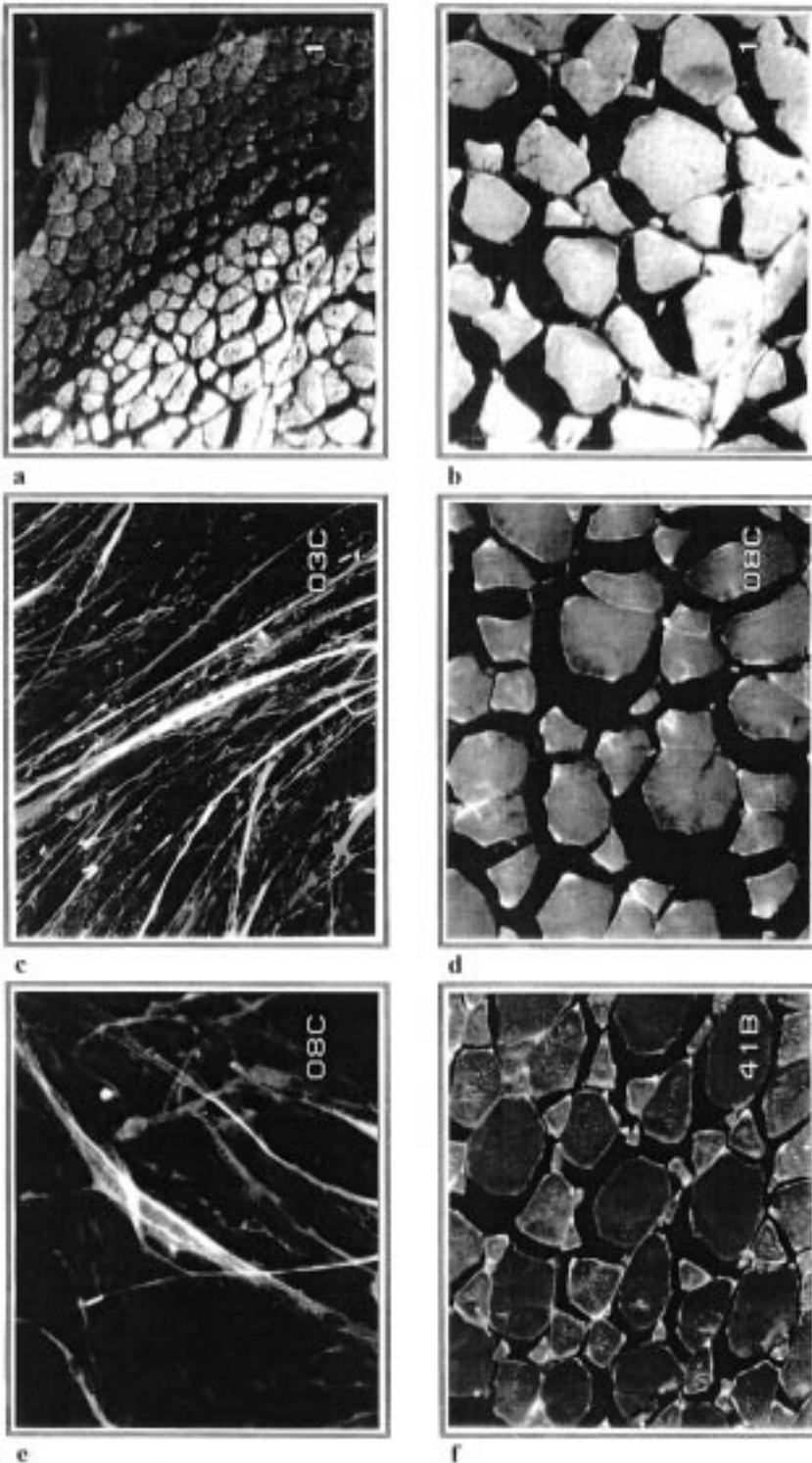
## Principaux résultats obtenus

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.