

## Une technique d'électrophorèse appliquée à la séparation des isoformes de chaînes lourdes de myosine du muscle squelettique de bovin

<sup>1</sup>Brigitte Picard, Christiane Barboiron, David Chadeyron, Catherine Jurie

Les isoformes de chaînes lourdes de myosine (MyHC), produits d'une famille multigénique, présentent des poids moléculaires très proches et par conséquent sont difficilement séparables par les techniques classiques d'électrophorèse SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis). Or, leur analyse présente un intérêt majeur car le type d'isoforme de MyHC d'une fibre donnée définit sa vitesse de contraction. Classiquement les révélations ont été faites par histochimie et immunohistochimie sur des coupes sériées de fibres musculaires. Toutefois, ces techniques sont lourdes à mettre en œuvre, peu représentatives de l'ensemble du muscle et ne sont pas quantitatives. Aussi, il apparaît nécessaire de pouvoir disposer de méthodes de quantification de ces isoformes à partir d'un broyat musculaire. Une méthode de séparation des MyHC de muscles de bovin en gradient de polyacrylamide avait été mise au point (Picard et al., 1999). Afin de simplifier encore la méthodologie utilisée nous avons adapté une méthode en mini gels qui s'affranchit de la réalisation d'un gradient de polyacrylamide. Cette méthode offre une très bonne résolution des MyHC de muscles de bovins et d'ovins.

**Résumé :** *La quantification de la proportion en isoformes de chaînes lourdes de myosine (MyHC) d'un muscle peut avoir de nombreuses applications, en particulier pour les animaux d'élevage comme le bovin pour lequel les études concernent principalement la maîtrise de la tendreté de la viande. Nous avons précédemment mis au point une technique de séparation des isoformes de MyHC bovines en gradient de polyacrylamide (Picard et al., 1999). Toutefois, cette technique présente des limites en particulier pour la maîtrise et la reproductibilité du gradient. Aussi, nous avons cherché à développer une méthode plus simple de séparation des isoformes de MyHC de muscles de bovins. Pour cela nous avons apporté des modifications à la méthode publiée par Talmadge and Roy en 1993 pour la séparation des MyHC de rat en mini gels à 8% d'acrylamide. La technique proposée dans cet article permet une très bonne résolution des MyHC de muscles de bovins mais aussi d'ovins, avec une bonne reproductibilité. Elle peut donc être appliquée pour toutes les études relatives à la composition en MyHC des muscles de ces deux espèces.*

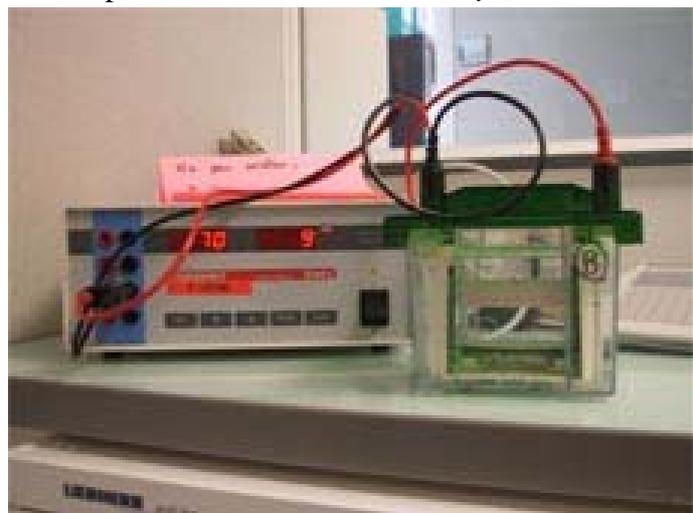
**Mots clés :** électrophorèse SDS-PAGE, chaînes lourdes de myosine, muscle squelettique, bovin

<sup>1</sup> INRA, Unité de Recherches sur les Herbivores, F-63122 Saint-Genès Champanelle ☎ 04 73 62 40 56

✉ [Brigitte.Picard@clermont.inra.fr](mailto:Brigitte.Picard@clermont.inra.fr)

## Introduction

La myosine, protéine myofibrillaire majeure, joue un rôle fondamental dans la physiologie musculaire. Elle est constituée de 2 chaînes lourdes (MyHC) et de 4 chaînes légères (MyLC). Les isoformes de chaînes lourdes sont liées à la vitesse de contraction des fibres. Ces isoformes, produits d'une famille multigénique, sont au nombre de 10 chez les mammifères (pour revue : Picard *et al.*, 2003). Dans le muscle adulte, 4 isoformes sont présentes selon les espèces : l'isoforme lente I (correspondant à la forme  $\beta$  cardiaque) et trois isoformes rapides IIa, IIx et IIb. D'autres isoformes sont exprimées transitoirement durant la vie fœtale, ou encore se retrouvent dans des muscles particuliers comme le muscle extra-oculaire (Pette and Staron, 2000). Toutes ces isoformes sont les produits de gènes différents, organisés en clusters sur deux chromosomes. Le gène codant l'isoforme I est lié au gène codant la MyHC alpha cardiaque sur un chromosome, et les autres gènes des MyHC squelettiques sont en tandem sur un autre chromosome (pour revue : Reggiani and Mascarello, 2004). Dans le muscle squelettique de bovin adulte, seules les isoformes I, IIa et IIx sont exprimées (Chikuni *et al.*, 2004) et sont présentes dans les fibres pures appelées respectivement I (lentes oxydatives), IIA (rapides oxydo-glycolytiques) et IIX (rapides glycolytiques) (Picard *et al.*, 2003). Elles peuvent aussi se trouver co-exprimées dans des fibres hybrides (Picard *et al.*, 2003). Ces différents types de fibres peuvent être révélés par des méthodes histochimiques et immunohistochimiques (Picard *et al.*, 1998 a et b). Toutefois, ces méthodes sont lourdes à mettre en œuvre sur de grosses séries d'échantillons et ne sont pas quantitatives. C'est pourquoi, nous avons conçu une technique d'électrophorèse SDS-PAGE inspirée des travaux de Carraro *et al.*, (1983), pour séparer les isoformes de MyHC de bovins (Picard *et al.*, 1999). Cette technique souffre cependant d'une difficulté de maîtrise et de mise en œuvre liée à la réalisation d'un gradient de polyacrylamide. Aussi, notre objectif a été d'adapter la technique décrite par Talmadge and Roy en 1993 qui a l'avantage de s'appuyer sur une séparation des MyHC en mini-gels à 8% d'acrylamide et qui évite la réalisation d'un gradient de polyacrylamide. Cette technique permet une très bonne résolution des MyHC de muscles squelettiques de rat, mais ne permet pas de séparer les MyHC de muscles bovins tout comme humains (Bamman *et al.*, 1999). Nous avons donc apporté des modifications à la méthode de Talmadge and Roy (1993) afin d'obtenir une séparation des isoformes de MyHC des muscles de bovins adultes. La technique retenue offre une bonne résolution de ces MyHC avec une bonne reproductibilité. Outre la simplification technique, elle donne une meilleure résolution qu'avec l'électrophorèse en gradient de Picard *et al.* (1999), notamment pour les isoformes rapides IIa et IIx.



**Photo 1** : Séparation des isoformes de MyHC de muscle de bovin en mini gels

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1 Préparation des échantillons

Pour les essais techniques nous avons utilisé des échantillons de muscles de bovins: *Longissimus thoracis* (LT), *Semitendinosus* (ST), *Triceps brachii* (TB), *Diaphragma* (Di), *Cutaneus trunci* (CT). Les trois premiers renferment des proportions différentes des trois MyHC, le Di de bovin ne contient que les MyHC I et Iia, alors que le CT ne contient que les isoformes rapides Iia et Iix (Picard *et al.*, 1994). Ces muscles ont été prélevés sur des bovins, dans l'heure suivant l'abattage, congelés directement dans l'azote liquide et stockés dans un congélateur à - 80 °C jusqu'aux analyses. Un échantillon de muscle LT pour lequel nous avons des données de composition en MyHC obtenues par électrophorèse en gradient de polyacrylamide selon la méthode de Picard *et al.*, (1999), a été inséré dans tous les gels comme référence. Un échantillon de muscle *Gastrocnemius* (Ga) de rat a été utilisé comme témoin. Le muscle LT a également été prélevé à l'abattage sur 12 agneaux mâles âgés de 6 mois. Les protéines myofibrillaires ont été extraites des différents muscles selon la technique utilisée pour les gels en gradient de polyacrylamide décrite dans Picard *et al.*, (1994) qui offre un meilleur rendement que la technique d'extraction de Talmadge and Roy (1993). La concentration en protéines des échantillons a été évaluée par la méthode de Bradford (1976).

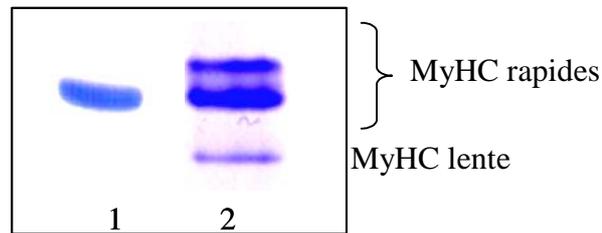
### 2.2 Conditions d'électrophorèse

Les protéines extraites sont diluées à 50% dans du tampon de Laemmli : 4% SDS, 125 mM Tris pH 6,8, 20% glycérol, 10%  $\beta$  mercaptoéthanol. L'échantillon est porté à 60°C pendant 10 minutes, puis 3  $\mu$ g de protéines sont déposés dans chacun des puits des mini gels de 0.75 mm d'épaisseur (cuve Protéan III de Biorad). La préparation des gels de séparation et de concentration est donnée dans le tableau 1. Comme dans la technique de Talmadge and Roy (1993), le tampon de cuve supérieure est composé de 0,1 M Tris (base), 150 mM glycine, 0,1% SDS, auquel est ajouté 10 mM de  $\beta$  mercaptoéthanol. Le tampon de cuve inférieure, lui est composé de 50 mM Tris (base), 75 mM glycine, 0,05% SDS. La migration est réalisée à 4°C, à un voltage de 70 volts pendant 30 heures sur un générateur Consort E861. A l'issue de la migration, les gels sont fixés dans un mélange éthanol 30% et acide acétique 5% puis colorés au bleu de Coomassie R250 selon le protocole décrit par Picard *et al.*, (1999), l'excès de coloration étant éliminé dans 2 bains successifs de mélange éthanol 30%, acide acétique 5%. Les gels colorés sont scannés à l'aide du scanner Chemilmager<sup>TM</sup> 5500 (Alpha Innotech Corporation), la proportion de chaque bande de MyHC est déterminée grâce au logiciel couplé au Chemilmager<sup>TM</sup> AlphaEaseFC .

### 2.3 Immunohistochimie

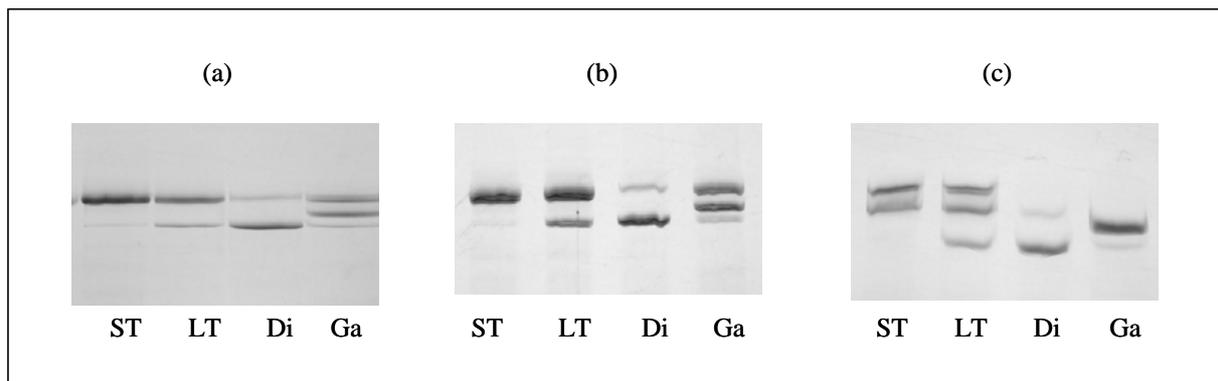
Les différentes MyHC ont été révélées sur des coupes sériées de 10  $\mu$ m d'épaisseur à l'aide d'anticorps spécifiques des MyHC bovines (Picard *et al.*, 1998b) selon le protocole d'immunohistochimie décrit dans Picard *et al.*, (1998a) sur des échantillons de muscle ST et LT. L'anticorps F36.5B9 (Alexis Biochemicals) est spécifique de la MyHC I, lente ; le F 113.15F4 (Alexis Biochemicals) reconnaît les MyHC rapides Iia et Iix dans le muscle bovin et le S5.8H2 reconnaît toutes les MyHC sauf la Iia (Picard *et al.*, 1998b). L'analyse comparative des réponses à ces trois anticorps sur des coupes sériées permet de classer les fibres en I, IIA et IIX, environ 100 fibres ont été analysées et comptées pour chaque muscle.

### 3. Résultats et discussion



**Figure 1 :** Séparation des isoformes de chaînes lourdes de myosine (MyHC) de muscle *Semitendinosus* de bovin adulte selon la méthode (1) de Talmadge and Roy (1993), (2) de Picard et al., (1999).

Avec la technique décrite par Talmadge and Roy (1993) on obtient une bonne séparation des MyHC de muscle de rat, mais on ne peut pas séparer les isoformes rapides de muscle de bovins, contrairement à la technique en gradient de polyacrylamide de Picard *et al.*, (1999) (**Figure 1**). Bamman *et al.*, (1999) avaient fait la même constatation à partir de muscle humain. La séquence en acides aminés des isoformes de MyHC dans les différentes espèces, bien que proche, n'est pas identique (Chikuni *et al.*, 2004). Ainsi, les poids moléculaires de ces isoformes sont différents selon les espèces, il est donc logique que les conditions d'électrophorèse adaptées à une espèce, ne le soient pas pour une autre. Aussi, il est nécessaire d'adapter les conditions afin d'optimiser la résolution obtenue pour chaque espèce. Partant de la technique de Talmadge and Roy (1993), nous y avons apporté plusieurs modifications successives : modifications de la composition du gel de séparation (T=8% et C=1,96% pour Talmadge and Roy (1993) vs T=9,2% et C=1,96% dans nos conditions), et de concentration (T= 4% pour Talmadge and Roy (1993) et T= 8,4% dans nos conditions) et augmentation du temps de migration de 24 à 30 heures, à 70 volts. Les principaux essais réalisés sont illustrés dans la **figure 2**.



**Figure 2 :** Différentes conditions d'électrophorèse

(a) Talmadge and Roy (1993) ; (b) Talmadge and Roy (1993) sans gel de concentration ;  
(c) Talmadge and Roy (1993) avec un gel de concentration modifié  
ST : *Semitendinosus*, LT : *Longissimus thoracis*, Di : *Diaphragma*,  
Ga : *Gastrocnemius* de rat

	Gel de séparation	Gel de concentration
Acrylamide (40%)	3,922	1,471
Acrylamide-bis (2%)	1,568	0,588
TRIS 2M pH 8,8	2,000	
TRIS 1M pH 6,8		0,700
Glycine 1M	2,000	
EDTA 100mM		0,400
Glycérol 87%	6,897	3,448
SDS 10%	0,800	0,400
TEMED	0,010	0,005
PAS 10%	0,200	0,100

**Tableau 1 :** Composition des gels de séparation et de concentration en ml, pour la préparation de deux mini gels de 0,75 mm d'épaisseur.

Toutes les solutions mères sont stockées à 4°C.

TEMED : N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine ;

Acrylamide-bis : N'-methylene-bis-acrylamide ;

SDS : sodium dodesyl sulphate ;

PAS : ammonium persulfate

Les compositions des gels de concentration et de séparation retenues sont données dans le **tableau 1**. Les principales modifications apportées portent sur la concentration en acrylamide qui est augmentée dans nos conditions dans les deux gels. En particulier, la concentration en acrylamide de notre gel de concentration est supérieure à ce qui est classiquement utilisé. Les essais réalisés montrent l'importance de l'effet de ce gel, puisque sans lui, en condition continue, nous n'obtenons pas de séparation des MyHC rapides (**figure 2b**). En revanche, en modifiant uniquement la concentration de ce gel nous séparons les isoformes MyHC IIa et IIx (**figure 2c**). En fait, le plus important dans un système discontinu est surtout la différence de pH, le passage du pH 6,8 à 8,8 provoque un ralentissement de la migration des protéines. Le fait que la migration dans le gel de concentration, plus concentré dans nos conditions, se fasse plus lentement dans nos conditions peut ralentir encore la pénétration des protéines dans le gel de séparation et amplifier ainsi l'effet « stacking ».

Ainsi, la méthode retenue détaillée dans le matériel et méthode, offre la meilleure résolution des trois bandes de MyHC (**figure 2c**), par contre elle ne sépare pas les MyHC du muscle de rat. Cette résolution est supérieure à celle que nous obtenions avec la méthode en gradient, elle est également bien meilleure que ce que l'on peut observer pour les autres espèces par exemple Bamman *et al.*, (1999) pour l'humain et Talmadge and Roy (1993) pour le rat. C'est à notre connaissance, la meilleure résolution des bandes de MyHC IIa et IIx obtenue.

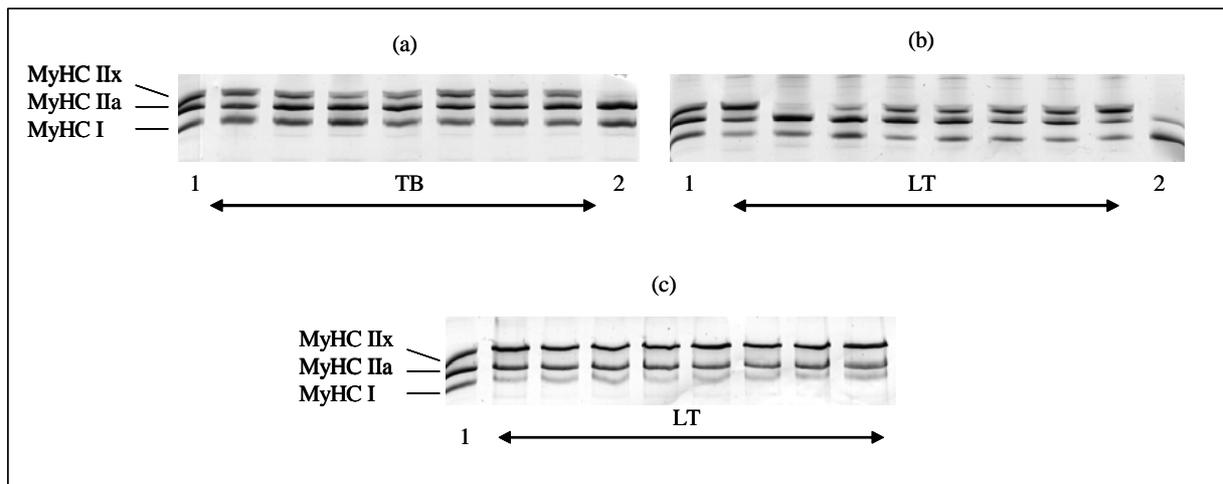
Afin de valider l'utilisation de cette technique, nous avons comparé pour un échantillon donné de chacun des muscles LT et ST, la composition en MyHC obtenue par cette technique et par celle en gradient de polyacrylamide (Picard *et al.*, 1999). Nous avons aussi comparé les compositions en MyHC obtenues par ces deux méthodes à la composition en fibres du même échantillon déterminée par immunohistochimie.

Les résultats de ces comparaisons (**tableau 2**), montrent des proportions de MyHC similaires dans les trois cas ce qui nous permet de valider l'utilisation de cette technique pour la séparation des MyHC de muscles de bovins.

		(1)	(2)	(3)
Muscle LT	MyHC I	20,8	22,7	22,4
	MyHC IIa	35	37,6	35,5
	MyHC IIx	44,2	39,7	42,1
Muscle ST	MyHC I	4,8	4,4	5
	MyHC IIa	19	18	20
	MyHC IIx	76,2	77,6	77,5

**Tableau 2 :** *Composition en MyHC (%) mesurée après séparation par électrophorèse (1) selon la présente méthode de Talmadge and Roy (1993) modifiée, (2) selon Picard et al. (1999) en gradient de polyacrylamide et (3) après révélation des MyHC par immunohistochimie (Picard et al., 1998a,b).*

D'autre part, nous avons utilisé dans chaque électrophorèse effectuée selon la méthode de Talmadge and Roy modifiée, un échantillon de LT pour lequel la composition en MyHC avait été déterminée par la méthode en gradient comme suit : 25%±3 MyHC I, 37%±4,9 MyHC IIa, 38%±5,3 MyHC IIX. Ainsi, déposé sur 50 gels différents de séparation de divers muscles (**figures 3a et 3b**), la composition moyenne obtenue pour cet échantillon (numéro 1 sur la figure 3) est de 22% ± 2,8% de MyHC I, 42 ±3,7% de MyHC IIa, 36±2,7% de MyHC IIx, et n'est pas significativement différente de la précédente. De plus, le coefficient de variation calculé sur l'ensemble de ces 50 gels, est de 8%. Enfin, cette technique appliquée à du muscle LT de mouton montre également une bonne résolution des MyHC dans cette espèce (**figure 3c**) avec des proportions en moyenne de 12% MyHC I, 28% MyHC IIa, 60% MyHC IIx, tout à fait comparables à celles obtenues par Laville et al. (2002) par une électrophorèse en gradient de polyacrylamide 5-8%. Nous constatons que les MyHC rapides d'ovins sont encore mieux séparées que celles de bovins. Toutefois, la distance de séparation entre les MyHC I et IIa est plus faible que pour le muscle de bovin (**figure 3c**).



**Figure 3 :** Exemples de séparation des isoformes de MyHC de muscles (a) *Triceps brachii* (TB) et (b) *Longissimus thoracis* (LT) de bovins et (c) de muscles LT d'ovins

1 : échantillon témoin de muscle LT mesuré également par la technique en gradient de Picard *et al.*, (1999) ;  
 2 : échantillon de muscle *Diaphragma* (Di) ne contenant que les MyHC I et IIa

## Conclusion

Cette méthode d'électrophorèse permet une bonne séparation des trois isoformes de MyHC de muscles de bovin et d'ovin avec une bonne reproductibilité. Elle peut donc être utilisée dans les différentes études du muscle dans ces espèces : ontogenèse, influence des facteurs de production et du type génétique sur la composition en MyHC ou encore relation entre cette composition et les qualités sensorielles de la viande.

## Bibliographie

- Bamman M.M., Clarke M.S.F., Talmadge R.J., Feeback D.L. (1999). Enhanced protein electrophoresis technique for separating human skeletal muscle myosin heavy chain isoforms. *Electrophoresis*, 20, 466-468.
- Bradford M.M. (1976). A fast and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.
- Carraro U., Catani C. (1983). A sensitive SDS-PAGE method separating myosin heavy chain isoforms of rat skeletal muscles reveals the heterogeneous nature of embryonic myosin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 116, 793-802.
- Chikuni *et al.*, Chikuni K., Muroya S., Nakajima I. (2004). Myosin heavy chain isoforms expressed in bovine skeletal muscles. *Meat Sci.*, 67, 87-94.
- Laville E., Bouix J., Sayd T., Eychenne F., Marq F., Leroy P.I., Elsen J.M., Bibé B. (2002). La conformation bouchère des agneaux. Etude d'après la variabilité génétique entre races. *INRA Prod. Anim.*, 15, 53-66.

- Pette D., Staron R. (2000). Myosin isoforms, muscle fibertypes, and transitions, *Microscopy Research and Technique*, 50, 500-509.
- Picard B., Robelin J., Pons F., Geay Y. (1994). Comparison of the foetal development of fiber types in four bovine muscles. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 15, 473-486.
- Picard B., Duris M.P., Jurie C. (1998a). Classification of bovine muscle fibres by different histochemical techniques. *Histochemical Journal*, 30, 173-479.
- Picard B., Lefaucheur L., Fauconneau B., Remignon H., Cherel Y., Barrey E., Nedelec J. (1998b). 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 Productions Animales*, 11, 145-163.
- Picard B., Barboiron, C., Duris M. P., Gagnière H., Jurie C., Geay Y. (1999). Electrophoretic separation of bovine muscle myosin heavy chain isoforms. *Meat Science*, 53, 1-7.
- Picard B., Jurie C., Cassar-Malek I., Hocquette J.F, Lefaucheur L., Berri C., Duclos M., Alami-Durante H., Rescan P. Y. (2003). Typologie et ontogenèse des fibres musculaires chez différentes espèces d'intérêt agronomique. *INRA Productions Animales*, 16, 117-123.
- Reggiani C., Mascarello F. (2004). Fibre type identification and functional characterization in adult livestock animals. In *Muscle Development of Livestock Animals: Physiology, Genetics and Meat Quality* (ed. H.P. Haagsmann, M.F.W. Te Pas and M.E. everts), pp 39-68. Wallingford, Oxfordshire: CABI Publishing.
- Tamadge R.J., Roy R.R. (1993). Electrophoretic separation of rat skeletal muscle myosin heavy-chain isoforms. *The American Physiological Society*, 75, 2337-2340.