



HAL
open science

Apport des outils cellulaires pour étudier la croissance musculaire chez le porc

Marie-Hélène Perruchot, Isabelle Louveau

► To cite this version:

Marie-Hélène Perruchot, Isabelle Louveau. Apport des outils cellulaires pour étudier la croissance musculaire chez le porc. 16. Journées Sciences du Muscle et Technologies des Viandes, Nov 2016, Paris, France. ADIV, Viandes et Produits Carnés, Hors-série, 2016, 16èmes Journées Sciences du Muscle et Technologies des Viandes. hal-02738698

HAL Id: hal-02738698

<https://hal.inrae.fr/hal-02738698>

Submitted on 2 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.

APPORT DES OUTILS CELLULAIRES POUR ETUDIER LA CROISSANCE MUSCULAIRE CHEZ LE PORC

PERRUCHOT M.H., LOUVEAU I.

PEGASE, Agrocampus Ouest, INRA, 35590 Saint-Gilles, France

marie-helene.perruchot@inra.fr

Abstract: The use of new cellular tools to study porcine muscle growth

The aim of the present work was to investigate the features of satellite cells and other adult stem cells in skeletal muscle. Satellite cells are located between the basal membrane and the sarcolemma of each muscle fiber. First, we developed a model based on muscle satellite cell culture to investigate the regulation of adult Myosin Heavy Chain (MyHC) isoform expression in pig muscle. Satellite cells were harvested from the mostly fast-twitch glycolytic *longissimus* (LM) muscle collected at the last rib level, and the predominantly slow-twitch oxidative *rhomboideus* (RM) muscle of 6-week-old piglets. Then, we investigated more extensively the features of all adult stem cells in both muscles of growing and adult pigs using flow cytometry. The first study demonstrated that satellite cells from LM and RM only expressed the embryonic and fetal MyHC isoforms in cell culture, without any of the adult MyHC isoforms expressed *in vivo*. The second study clearly indicated that adult stem cells from pig skeletal muscles expressed a panel of stem cell markers exhibiting age-related changes.

Introduction

Les cellules souches adultes sont des cellules multipotentes capables de s'auto-renouveler et de donner naissance à plusieurs types de cellules spécialisées dans un tissu donné. Dans le muscle squelettique, les cellules satellites sont les cellules souches les plus étudiées. Chez l'adulte, ces dernières sont positionnées le long des fibres musculaires dans un état de dormance. L'activation et la prolifération de ces cellules permettent à l'adulte d'augmenter sa masse musculaire. Nous nous intéressons à ces cellules comme levier potentiel pour mieux gérer l'adaptation tissulaire au cours de la croissance, pouvant in fine modifier la qualité de la viande. Le but de ce travail est d'étudier les caractéristiques des cellules souches adultes y compris les cellules satellites durant le développement musculaire du porc. Nous avons d'abord développé un modèle de culture de cellules satellites pour étudier la régulation de l'expression des isoformes de chaînes lourdes de myosines (MyHC) adultes dans deux muscles à activités métaboliques et contractiles contrastées : un muscle glycolytique à contraction rapide (*longissimus*, LM), et un muscle oxydatif à contraction lente (*rhomboideus*, RM) chez le porcelet (Perruchot *et al.*, 2012). Etant donné que la composition en type de fibres a été rapportée comme influençant les performances de croissance et la qualité de la viande, le contrôle de l'expression des MyHC est un défi majeur pour les producteurs de viande. Nous avons étudié de façon plus approfondie les caractéristiques des cellules souches adultes des muscles LM et RM (Perruchot *et al.*, 2013) à plusieurs stades de développement du porc par cytométrie en flux en utilisant des marqueurs de surface cellulaires bien caractérisés (Péault *et al.*, 2007) afin de suivre leur évolution au cours de la croissance.

Matériel et méthodes

Isolement et culture des cellules de la fraction stroma-vasculaire (FSV) du muscle. Les cellules de la FSV et les cellules satellites sont isolées à partir des muscles RM et LM (Theil *et al.*; 2006 ; Perruchot *et al.*, 2013). Les cellules de la FSV et les cellules satellites sont mises en culture dans du milieu de prolifération, milieu de Eagle modifié par Dulbecco (DMEM) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF), 10% de sérum de cheval, et des antibiotiques pendant 7 jours puis sont placées en milieu de différenciation (DMEM contenant 5% de SVF) en absence ou en présence de concentrations croissantes de T3 pendant 5 jours. Cette hormone est connue pour induire un phénotype plus rapide dans le muscle squelettique adulte et l'expression de MyHC α -cardiaque dans le myocarde ventriculaire (Lompre *et al.*, 1984).

Séparation des MyHC par électrophorèse. Les cellules en culture sont récupérées dans du Laemmli 1X et les protéines sont ensuite extraites puis dosées. Les MyHC sont séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS (10 μ g de charge protéique par puits ; Lefaucheur *et al.*, 2001). Après 30 h de migration à 5°C et à 72 V, les gels sont colorés au bleu de Coomassie, numérisés et analysés en utilisant le logiciel ImageMaster 2D Platinum, version 6.0 (GE Healthcare). Les bandes correspondant aux différentes isoformes de MyHC sont identifiées grâce à des standards.

Analyse des cellules de la FSV du muscle par cytométrie en flux. Les cellules vivantes sont analysées pour les marqueurs de surface cellulaire (Tableau 1). Le marqueur CD45 est utilisé pour exclure les cellules hématopoïétiques exprimant ce marqueur. Les cellules sont placées dans du tampon phosphate et incubées à l'abri de la lumière (30 min sur de la glace) avec des anticorps monoclonaux marqués et couplés à des fluorochromes différents. Après lavage, les cellules sont analysées en utilisant le cytomètre MACSQuant® et les logiciels associés (Miltenyi Biotec, Paris, France).

Tableau 1 : Liste des anticorps utilisés en cytométrie de flux pour caractériser les cellules musculaires

| Marqueur | Isotype | Fluorochrome | Clone |
|----------|-------------|--------------|-----------|
| CD34 | mouse IgG1 | PE | 563 |
| CD45 | mouse IgG1 | FITC | K252-1E4 |
| CD56 | mouse IgG2b | PE-cy7 | NCAM 16.2 |
| CD90 | mouse IgG1 | APC | 5E10 |

Résultats et Discussion

Figure 1 : Séparation par électrophorèse des MyHC des cellules satellites de LM après 4 jours de culture dans un milieu de différenciation contenant des concentrations croissantes de T3 Std = mélange de LM et RM fœtaux et adultes pour localiser les isoformes de MyHC embryonnaires (a) et fœtales (b) et adultes rapides de type II (bande c = IIa + IIx + IIb) et I (groupe d). Les MyHC ventriculaires (V) et auriculaires (A) permettent de visualiser la MyHC rapide et l' α -cardiaque.

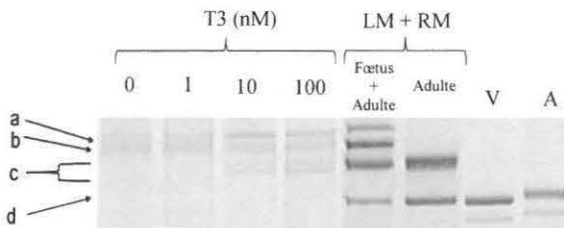
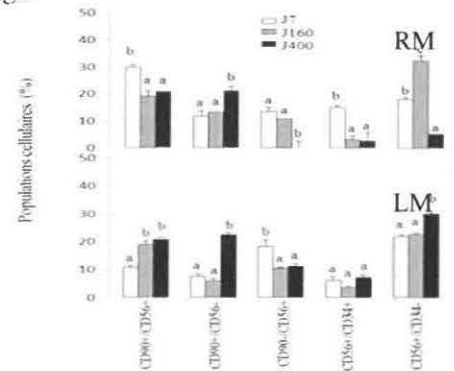


Figure 2 : Expression des marqueurs de surface CD34, CD56 et CD90 dans les cellules stroma-vasculaires isolées à partir du RM et du LM de porcs de 7, 160 et 400 jours d'âge.



L'analyse des cellules satellites par électrophorèse montre que, seules les isoformes de myosines embryonnaires et fœtales, sont exprimées dans les muscles LM et RM. La mise en évidence d'une composition en MyHC similaire suggère une population uniforme de cellules satellites dans les deux muscles. Afin de vérifier la réponse de notre système cellulaire à des stimuli hormonaux, nous avons étudié l'influence de la T3 sur les cellules en culture. Les doses croissantes de T3 induisent l'expression *de novo* de deux bandes correspondant à la MyHC rapide adulte et à la MyHC α -cardiaque (Figure 1). Ces données suggèrent que les différences observées *in vivo* dans la composition en fibres des muscles LM et RM ne sont probablement pas dues à des différences inhérentes aux cellules satellites mais dépendent plutôt de facteurs tels que l'innervation et l'activité contractile associée.

Les résultats d'analyse en cytométrie montrent l'existence de plusieurs populations de cellules souches dans les deux muscles dont les proportions peuvent varier avec l'âge. Dans les deux muscles, la proportion de cellules CD90⁺/CD56⁻ augmente avec l'âge ($p < 0,001$) (Figure 2). Dans le RM, la proportion de cellules CD56⁺/CD34⁺ correspondant aux cellules satellites chez le porc (Perruchot *et al.*, 2012) chute après 160 jours d'âge. A l'inverse, dans le LM, cette réduction de cellules avec l'âge n'est pas observée. Ce résultat suggère que la forte diminution de cette proportion de cellules CD56⁺/CD34⁺ dans le RM est associée à une forte diminution du potentiel myogénique dans ce muscle, alors que celle du LM semble être conservée. Le rôle de l'augmentation des cellules CD90⁺/CD56⁻ au cours de la croissance est à approfondir.

Conclusion

Les muscles LM et RM sont constitués de plusieurs populations de cellules souches adultes. Les cellules satellites en culture possèdent le même profil en MyHC dans les deux muscles. Cependant la proportion de ces cellules et leur évolution avec l'âge diffèrent entre les muscles LM et RM ; ceci peut être relié à l'activité du muscle ou à son évolution au cours de la croissance. Par la suite, il serait intéressant de regarder l'évolution de ces populations cellulaires en lien avec un challenge nutritionnel ou environnemental affectant ou modifiant la composition corporelle de l'animal et la qualité de la viande.

Références bibliographiques

- Lefaucheur L. *et al.*, (2001). J. Muscle Res. Cell. Motil. 22: 439-452.
 Lompre A.M., Nadal-Ginard B., Mahdavi V., (1984). J. Biol. Chem. 259: 6437-6446.
 Péault B. *et al.*, (2007). Mol. Ther. 15: 867-877.
 Perruchot M.H. *et al.*, (2012). Differentiation 84: 322-329.
 Perruchot M.H. *et al.*, (2013). Am J Physiol Cell Physiol.305: C728-C738.
 Theil P.K. *et al.*, (2006). Anim. Sci. J. 77: 330-337.