



HAL
open science

Etude expressionnelle de gènes impliqués dans la fusion des myocytes au cours de la régénération musculaire chez la truite

Maxime M. Hertling, Département Génie Biologique

► **To cite this version:**

Maxime M. Hertling, Département Génie Biologique. Etude expressionnelle de gènes impliqués dans la fusion des myocytes au cours de la régénération musculaire chez la truite. Sciences du Vivant [q-bio]. 2015. hal-02943001

HAL Id: hal-02943001

<https://hal.inrae.fr/hal-02943001>

Submitted on 18 Sep 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.

Option Analyses Biologiques et
Biochimiques (ABB)

Rapport de stage

Étude expressionnelle de gènes impliqués
dans la fusion des myocytes au cours de la
régénération musculaire chez la truite

Stage effectué au Laboratoire de Physiologie et Génomique des Poissons (LPGP)
de l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA)

Campus de Beaulieu, Bâtiment 16A
35042 Rennes Cedex



Confidentialité : non

Maître de stage : Monsieur GABILLARD
Chargé de recherche, animateur d'équipe

Tutrice de stage : Madame OBITZ
Enseignante IUT de Laval

Stage du 30/03/2015 au 05/06/2015

Option Analyses Biologiques et
Biochimiques (ABB)

Rapport de stage

Étude expressionnelle de gènes impliqués
dans la fusion des myocytes au cours de la
régénération musculaire chez la truite

Stage effectué au Laboratoire de Physiologie et Génomique des Poissons (LPGP)
de l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA)

Campus de Beaulieu, Bâtiment 16A
35042 Rennes Cedex

Confidentialité : non

Maître de stage : Monsieur GABILLARD
Chargé de recherche, animateur d'équipe

Tutrice de stage : Madame OBITZ
Enseignante IUT de Laval

Stage du 30/03/2015 au 05/06/2015

Remerciements

Tout d'abord je tiens à remercier Monsieur HERPIN pour m'avoir accueilli au sein du centre de recherche INRA de Rennes, et de m'avoir permis de réaliser mon stage de fin de deuxième année de DUT Génie Biologique option ABB.

Je voudrais exprimer toute ma gratitude à mon maître de stage, Monsieur GABILLARD Jean-Charles, pour sa présence et son aide lors de la réalisation de mon sujet de stage.

Je tiens également à remercier Monsieur PRUNET Patrick, responsable du laboratoire dans lequel s'est déroulé mon stage, ainsi que tous les membres du personnel qui m'ont guidé et conseillé au cours de ces 10 semaines d'insertion professionnelle. Je remercie particulièrement Madame LANDEMAINE Aurélie et Madame SABIN Nathalie pour m'avoir présenté les projets du laboratoire et pour m'avoir aidé lorsque des difficultés ont été rencontrées.

Finalement, je souhaite exprimer ma reconnaissance à ma tutrice de stage, Madame OBITZ Bénédicte, qui a su être accessible et qui s'est montrée intéressée tout au long du stage.

Sommaire

Table des tableaux et figures.....	1
Table des abréviations et définitions.....	2
Présentation de l'équipe de recherche Croissance et Qualité de la Chair.....	3
Introduction.....	4
I. Matériel et Méthodes.....	6
A. Expérimentation.....	6
B. Histologie.....	6
1. Déshydratation des échantillons fixés.....	6
2. Inclusion des échantillons dans la paraffine.....	7
3. Coupe des échantillons au microtome.....	7
4. Coloration des lames à l'Hématoxyline de Weigert et colorant Rojkind.....	8
5. Immunocytofluorescence.....	8
C. Extraction des ARN totaux.....	9
D. Transcription Inverse (RT).....	10
E. Réaction de Polymérase en Chaîne quantitative (qPCR).....	11
F. Analyses statistiques.....	12
II. Résultats.....	13
A. Description histologique de la régénération musculaire.....	13
B. Analyse expressionnelle de gènes lors de la régénération musculaire.....	16
III. Discussion.....	19
A. Description histologique.....	19
B. qPCR.....	20
IV. Conclusion.....	21
Bilan personnel.....	22
Bibliographie.....	23

Table des tableaux et figures

Tableau 1 : Protocole de la coloration Rojkind et Hématoxyline de Weigert.....	8
Figure 1 : Schéma d'une truite, présentant la zone de lésion et prélèvement.....	6
Figure 2 : Schéma présentant la préparation d'un échantillon inclus dans la paraffine.....	7
Figure 3 : Principe de la Transcription Inverse.....	10
Figure 4 : Principe de l'analyse par qPCR.....	11
Figures 5 : Observation au microscope optique (X200), de muscle de truite coloré au colorant de Rojkind et hématoxyline de Weigert à différents temps d'incubation.....	13
Figures 6 : Observations au microscope optique (X50), de la mise en place puis de l'évolution de la régénération musculaire chez la truite à la suite d'une lésion.....	15
Figure 7 : Observation par immunocytofluorescence anti-myosine d'une coupe de muscle lésé de truite après 30 jours de régénération, microscope optique à fluorescence, (X200).....	15
Figures 8 : Courbes obtenues avec l'automate à l'issue de qPCR. En A : courbe d'amplification, en B : courbe standard, en C : courbe de fusion.....	16
Figures 9 : Cinétiques d'expression des gènes lors de la régénération musculaire suite à une lésion.....	18

Table des abréviations - Définitions

siRNA : - small interfering RNA, ou pARNi : petit ARN interférent.

- Séquence d'acides nucléiques se fixant sur un ARN messenger pour le cliver, empêchant ainsi l'expression du gène associé à la séquence de l'ARNm clivée.

Lignée C2C12 : lignée cellulaire monoclonale stable de myoblaste de souris

Myogénèse : phénomène biologique conduisant à la formation des fibres musculaires

Myofibre : fibre musculaire

Myosepte : cloison conjonctive séparant les myomères les uns des autres

Téléostéens : groupe des poissons osseux, contenant plus de 20 000 espèces

Wisp1a : WNT1 inducible signaling pathway protein 1, ou WNT1 inducible par la protéine de signalisation de la voie 1

Naa15a : N(α)-acetyltransferase 15

RT-qPCR : - Reverse Transcription – quantitative Polymerase Chain Reaction

- La RT est une méthode permettant de passer d'un ARN à un ADN grâce à une enzyme, la qPCR est une méthode permettant d'amplifier une séquence d'acides nucléiques (amplicon) d'un ADN, tout en mesurant à chaque fin de cycle la quantité d'amplicon présents.

DEPC : DiEthyl-PyroCarbonate

dNTP : désoxyribo – Nucléotide TriPhosphate

Il s'agit du mélange des quatre désoxyribonucléotides (Adénine, Guanine, Cytosine et Thymines) associés à un sucre : le désoxyribose, et à une molécule : le tri-phosphate.

ADNc : ADN complémentaire

C'est le brin d'ADN qui va être synthétisé à partir d'un ARN.

PBS : Phosphate Buffered Saline : Tampon Phosphate Salin

BSA : Bovine Serum Albumine : Albumine Sérique Bovine

Anticorps SC-71 : Anticorps monoclonal de souris dirigé contre la myosine

Présentation de l'équipe de recherche Croissance et Qualité de la Chair

Le Laboratoire de Physiologie et Génomique des Poissons (LPGP) de l'INRA mène des recherches orientées par des questionnements scientifiques sur des enjeux du domaine aquacole. Ces recherches sont centrées sur la biologie et la physiologie du poisson.

La démarche scientifique comprend plusieurs approches : méthodologie (génomique, biologie cellulaire), biologie intégrative (de la molécule à l'organisme), et biologie comparée entre modèles biologiques. Les domaines d'expertise scientifique et d'enseignement sont aussi présents au sein du laboratoire.

Le LPGP est composé de 4 équipes de recherche, celle qui nous intéresse, dans laquelle le stage a été effectué, est l'équipe "Croissance et Qualité de la Chair".

Cette équipe étudie les mécanismes biologiques qui sont à l'origine de la formation des tissus contenus dans le muscle (myofibres, tissus conjonctifs et adipeux), et elle examine la régulation de ces mécanismes par les facteurs génétiques et/ou les conditions d'élevage. L'ensemble des travaux de cette équipe vise à acquérir une plus grande maîtrise de la croissance des poissons et des propriétés qualitatives de leur chair.

Il existe deux thématiques scientifiques au sein de cette équipe, le stage s'est déroulé dans le cadre de la thématique «Développement embryonnaire et croissance des différents compartiments tissulaires du muscle axial du poisson ». Au sein de cette thématique existent finalement 4 axes de recherche, l'axe nous intéressant étant la « Régulation de l'activité des cellules souches musculaires ».

L'équipe du laboratoire au sein de laquelle le stage a été effectué a à sa tête Jean Charles Gabillard, en qualité d'animateur d'équipe et chargé de recherche. Celui ci travaille en collaboration avec F. Lefèvre et X. Cousin (chargés de recherche), P-Y. Rescan (directeur de recherche), et A. Landemaine (doctorante). L'équipe est aidée par une assistante ingénieur et deux techniciennes.

Introduction

Le muscle squelettique se compose de fibres musculaires qui représentent 75 à 90 % du volume musculaire. Ces fibres sont principalement constituées de myofilament épais de myosine et de myofilaments fins d'actine. Les noyaux des fibres musculaires matures sont situés en périphérie de la fibre musculaire.

Chez les mammifères adultes, la croissance musculaire résulte uniquement de l'accroissement en taille des fibres musculaires, due à l'augmentation de la synthèse de protéines et du nombre de noyaux présents dans les fibres. Cette augmentation du nombre de noyaux, se fait grâce aux cellules souches musculaires aussi appelées cellules satellites. Les cellules satellites sont les cellules souches qui vont se différencier en myoblastes. Les myoblastes sont des cellules prolifératives qui peuvent se différencier en myocytes, qui ne sont, eux, pas prolifératifs. Ce sont finalement ces myocytes qui vont pouvoir fusionner entre eux afin de former des myotubes puis mûrir en fibres musculaires. Ces myocytes peuvent également fusionner avec des myotubes déjà existants afin d'obtenir des fibres plus grandes. On parlera dans le premier cas du phénomène d'hyperplasie musculaire, et dans le second du phénomène d'hypertrophie musculaire. Contrairement aux mammifères, la croissance du muscle chez les poissons résulte à la fois d'une hypertrophie et d'une hyperplasie des fibres musculaires (Alami-Durante et al, 2010) (Rescan et al, 2008).

Outre les processus de croissance musculaire par hypertrophie et hyperplasie, les cellules satellites sont indispensables au processus de régénération musculaire. Cette régénération du muscle a lieu lors d'une lésion, le plus souvent liée à une cause extrinsèque. On connaît la contusion (choc direct sur le muscle, petite hémorragie et écrasement ou déchirure des fibres), la déchirure (rupture d'un nombre important de fibres musculaires, hémorragie locale) ou encore l'élongation (micro-déchirures dues au dépassement de l'élasticité du muscle).

La régénération musculaire consiste entre autre, en la production de nouvelles fibres musculaires, c'est à dire une hyperplasie. Concrètement, la régénération musculaire débute par l'activation des cellules satellites. En effet, celles-ci sont, chez le modèle de la truite arc en ciel, totalement inactives après 18 mois post-fécondation (Rescan et al, 2015). Lors d'une régénération musculaire, les cellules souches satellites, dont l'action était probablement inhibée par des changements de l'environnement du muscle squelettique âgé, vont donc pouvoir s'activer de

nouveau. Elles vont alors proliférer et se différencier en myoblastes afin de lancer un cycle de formation de nouvelles fibres par hyperplasie. Ces fibres nouvellement formées pourront alors plus tard grossir grâce au phénomène d'hypertrophie.

Le mécanisme de fusion entre myocytes ou entre un myocyte et un myotube ou une fibre, peut se décomposer en plusieurs étapes successives. Dans un premier temps, les cellules vont migrer jusqu'à leur partenaire de fusion. Une fois en contact, les cellules vont pouvoir adhérer l'une avec l'autre grâce à la reconnaissance de protéines transmembranaires spécifiques à chaque type de cellule. Enfin, les membranes plasmiques des 2 cellules vont fusionner et les noyaux vont migrer au centre de la cellule.

Au sein de l'équipe, deux gènes potentiellement impliqués dans la régénération musculaire ont été identifiés à l'aide d'un crible fonctionnel faisant appel à la technologie siRNA. Une implication de ces gènes dans la myogenèse n'a jusqu'à présent jamais été rapporté.

Le gène WNT-induced secreted protein-1 (Wisp1) est un membre de la famille CCN (Cystein-rich 61, connective tissue, and nephroblastoma growth factors). C'est une protéine de la matrice extracellulaire jouant un rôle dans la croissance cellulaire, la transformation et la survie cellulaire (Colston et al 2007).

Le gène Naa15 appartient à la famille des acetyl-transférases, mais aucune fonction ne lui a été rapportée à ce jour. Ces protéines sont des enzymes qui ajoutent un groupement acetyl sur les protéines et participent à leur modification post-traductionnelle et ainsi influencent leur action.

Compte tenu de la duplication des génomes chez les poissons téléostéens (Bertelot et al 2014), il existe chez le poisson zèbre 2 gènes Wisp1 (Wisp1a et Wisp1b) et quatre chez la truite (Wisp1a(1), Wisp1a(2), Wisp1b(1), Wisp1b(2)). Pour les mêmes raisons, il existe chez le poisson zèbre 2 gènes Naa15 (Naa15a et Naa15b) et quatre chez la truite (Naa15a(1), Naa15a(2), Naa15b(1), Naa15b(2)). Des résultats préliminaires dans l'équipe ont montré que seul Wisp1a et Naa15a étaient potentiellement impliqués dans la fusion des myocytes chez le poisson zèbre.

L'objectif de ce stage est donc tout d'abord de caractériser histologiquement les phénomènes de régénération musculaire chez la truite puis d'étudier l'expression des gènes Naa15a et Wisp1a dans la fusion des myocytes au cours de cette régénération.

I. Matériel et Méthodes

A. Expérimentation

L'expérience a été réalisée au sein de la Pisciculture Expérimentale INRA des Monts d'Arrée (PEIMA) avec des truites arc en ciel (*Oncorhynchus mykiss*).

Au début de l'expérience, 84 truites arc en ciel anesthésiées ont été piquées avec une aiguille (diamètre 1,2mm) au niveau du muscle dorsal gauche, près de la nageoire dorsale. Chaque poisson a été lésé à 2 endroits différents : une zone a été lésée par une piqûre unique afin de faire une observation histologique, une autre zone a été piquée de manière répétée afin d'obtenir une large zone de régénération, permettant ainsi de mesurer l'expression des gènes par RT-qPCR. Les zones de lésion sont espacées d'environ 1 cm.

Ensuite, aux jours 0, 1, 2, 4, 8, 16 et 30, 12 truites sont sacrifiées et 2 échantillons d'environ 100 mg de ce muscle lésé sont prélevés sur chaque poisson. A noter que du muscle a également été prélevé sur le côté droit du muscle dorsal (non lésé) et correspond aux échantillons contrôles.



Figure 1: Schéma d'une truite, présentant la zone de lésion et prélèvement

B. Histologie

1. Déshydratation des échantillons fixés

Juste après le prélèvement les échantillons sont plongés (24h minimum) dans une solution de Carnoy (10 % acide acétique, 30 % chloroforme, 60 % éthanol) qui permet la conservation de leur structure. Ensuite, les échantillons sont déshydratés à l'aide d'un automate STP 120 de Thermo Scientific, pour permettre leur inclusion dans la paraffine. L'automate va plonger l'échantillon dans des bains successifs : 3x1h dans l'alcool 96°, 3h dans un mélange alcool 96°/butanol, 3x3h dans le butanol et finalement 1h puis 2x2h dans la paraffine. L'alcool 96° et le butanol ont un pouvoir déshydratant (le butanol encore plus que l'éthanol) et la paraffine imprègne les échantillons afin de faciliter la coupe histologique par la suite.

2. Inclusion des échantillons dans la paraffine

L'automate TBS88 de Medite est utilisé. C'est un système permettant de maintenir de la paraffine dans un état de fusion, afin de la faire couler par un robinet. L'automate comporte également un socle refroidi afin de durcir la paraffine plus rapidement. Les échantillons sont placés dans un bain de paraffine, c'est à dire qu'on coule de la paraffine dans un moule puis on place l'échantillon à l'intérieur, après l'avoir sorti de sa cassette. La partie inférieure de la cassette est alors placée par dessus l'échantillon. Le montage est ensuite placé sur le socle froid afin de durcir la paraffine.

3. Coupe des échantillons au microtome

L'analyse histologique a été réalisée sur 5 échantillons par temps, afin de préserver les autres échantillons pour des analyses complémentaires si besoin.

En premier lieu, le bloc de paraffine, dans lequel l'échantillon est inclus, est taillé à l'aide d'un scalpel. C'est à dire que la paraffine en surplus autour de l'échantillon est éliminée. Une forme de trapèze est donnée au bloc afin de connaître le sens dans lequel sera l'échantillon après obtention du bandeau de paraffine lors de la découpe. (Illustration 2)

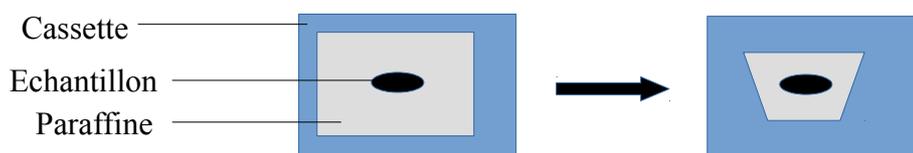


Figure 2 : Schéma présentant la préparation d'un échantillon

Par la suite, des coupes histologiques (10 μ m) de l'échantillon sont obtenus à l'aide au microtome Microm HM355S de Thermo Scientific. Huit coupes sont récupérées par échantillon, puis sont disposées sur 2 lames différentes. Après avoir vérifié que la coupe se situe bien au niveau de la lésion du muscle par observation au microscope optique, de l'albumine 0,5 % est ajoutée afin de faire adhérer la coupe sur la lame, puis celles-ci sont mises à sécher sur une platine chauffante réglée à 37°C. Les lames ainsi réalisées sont ensuite placées dans une étuve à 37°C en attendant d'être colorées.

4. Coloration des lames à l'Hématoxyline de Weigert et colorant Rojkind

L'automate de coloration Microm HMS 760X de Thermo Scientific est utilisé pour réaliser la coloration de Rojkind couplée à celle d'hématoxyline de Weigert (Tableau 1). L'hématoxyline de Weigert (Hématoxyline 1 % dans alcool 96° et chlorure ferrique dans acide chlorhydrique 2,5 %) colore les noyaux en noir, tandis que le colorant Rojkind (1 volume de Fast Green 0,1 % et 5 volumes Rouge Sirius 0,1 %) colore les fibres musculaires en vert grâce au Fast Green, et le collagène en rouge grâce au Rouge Sirius. Le toluène puis les alcools permettent le déparaffinage des échantillons. Nous avons tout d'abord testé la coloration Rojkind/hématoxyline de Weigert afin de déterminer le temps optimal (4, 6 ou 10 min) à la coloration des fibres musculaires.

Étape	Réactif	Temps d'incubation (±)
1	Toluène	10 min ± 2 min
2	Alcool 100°	3 min ± 1 min
3	Alcool 96°	3 min ± 1 min
4	Alcool 70°	5 min ± 1 min
5	Eau courante	2 min
6	Eau distillée	5 min ± 1 min
7	Hématoxyline de Weigert	10 min
8	Eau courante	5 min ± 1 min
9	Mélange de Rojkind	4/6/10 min
10	Isopropanol	5 min
11	Toluène	10 min ± 1 min
12	Toluène	Jusqu'à la sortie

Tableau 1 : Protocole de la coloration Rojkind et hématoxyline de Weigert

5. Immunocytofluorescence

Pour 2 échantillons de chaque temps, 4 coupes ont été réalisées et placées sur une lame. Les coupes sont incubées une heure dans un tampon de saturation (BSA 1 %, 0,1 % Tween20, PBS) afin de limiter les interactions protéine-protéine, et de saturer les sites de fixations disponibles pour que l'anticorps primaire ne se fixe que sur son antigène. Après un rinçage rapide au PBST (PBS+0,1% Tween20), les coupes d'échantillons ont été mises en présence d'un anticorps monoclonal anti-myosine fait chez la souris (SC71). Cet anticorps est dilué au 1/10ème dans du tampon de

saturation. Après 3 heures d'incubation, les coupes sont lavées 5 fois pendant 5 min avec du PBST, puis incubées en présence d'un anticorps secondaire anti-souris (1/1000ème, Molecular Probe A11001) couplé à un agent fluorescent. Des montages lame-lamelle sont ensuite réalisés avec le milieu de montage Mowiol, contenant du Hoechst 0,1 % (colorant fluorescent bleu). A l'aide d'un microscope à fluorescence, il sera possible de détecter les fibres musculaires (fluorescence verte) et les noyaux (fluorescence bleu).

3. Extraction des ARN totaux

Chaque échantillon de muscle (environ 100mg) est broyé dans 1 mL de TRI Reagent (Sigma-Aldrich) pour précipiter et dégrader les protéines. Après 5 minutes à température ambiante 200 µL de chloroforme sont ajoutés à l'aide d'une micropipette P200, puis les échantillons sont vortexés 15 secondes. Après 10 minutes à température ambiante les échantillons sont centrifugés à 12 000 g pendant 15 minutes, à 4 °C. Cette centrifugation va donc séparer le broyat en 3 phases différentes : la phase organique (rouge) contenant les protéines qui ont précipité grâce au chloroforme dans la partie inférieure du tube, l'interphase contenant l'ADN, et la phase aqueuse (incolore) contenant l'ARN dans la partie supérieure du tube. Cinq cents microlitres de phase aqueuse sont transférés dans un nouveau tube de 1,5 mL, auxquels sont ajoutés 500 µL d'isopropanol qui permet la précipitation des ARN. Après 10 min de précipitation à température ambiante, les échantillons sont centrifugés à 12 000 g pendant 10 minutes, à 4 °C. Les ARN sont alors précipités en culot sur le côté et le fond du tube. Le surnageant est éliminé et le culot est repris avec de l'éthanol 75 %. L'éthanol permet de garder l'ARN sous forme de précipité car ce dernier n'est pas soluble dans l'alcool. Les échantillons sont à nouveau centrifugés à 7 500 g pendant 5 minutes, à 4 °C puis le surnageant est éliminé et le culot est séché sous hotte. Cette étape permet d'éliminer l'excès d'éthanol. La suite de la manipulation se fait sur glace afin d'éviter une dégradation de l'ARN. Le culot est repris avec 100µl d'eau traitée au DEPC. La concentration en ARN des échantillons est déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre (Nanodrop) en mesurant l'absorbance à 260 nm car c'est à cette longueur d'onde qu'est le pic d'absorbance des acides nucléiques. L'absorbance à 280 nm (pic d'absorbance des protéines) est également mesurée, afin de vérifier que l'ARN n'est pas contaminé par des protéines.

L'intégrité des ARN est ensuite vérifiée en les faisant migrer dans un gel d'agarose contenant du SYBR Safe qui colore les acides nucléiques, qui seront alors visibles sous un éclairage aux UV.

4. Transcription Inverse (RT)

Cette réaction enzymatique a pour but de synthétiser des brins d'ADN complémentaires (ADNc) à partir des ARN totaux.

Toute la préparation est réalisée sur glace afin de ne pas dégrader les ARN, et de ne pas activer l'enzyme. La réaction de transcription inverse se réalise dans une plaque de 96 puits en déposant 1 µg d'ARN totaux de chaque échantillon. Un prémix à déposer dans chaque puits est ensuite réalisé. Il faut dans celui-ci, et pour chaque puits, 2,5 µL de tampon 10X, 1 µL de dNTP 25X, 2,5 µL de primer aléatoires 10X et 1,25 µL de l'enzyme Reverse Transcriptase 20X. Ce qui fait un volume de 7,25 µL par puits. Le prémix ainsi préparé sera d'un volume 90 fois égal à celui-ci, pour le total des puits, et 7,25 µL seront ajoutés dans chaque puits à l'aide d'une micropipette P10.

La plaque est alors placée dans l'automate C1000 Thermal Cycler de BIORAD, qui va permettre la réalisation de la réaction. En effet l'automate va activer l'enzyme grâce au chauffage de la plaque jusqu'à la température optimale d'action de la reverse transcriptase (37°C), puis dénaturer cette enzyme grâce à un chauffage intense (95°C), ce qui va permettre la fin de la réaction.

A la sortie de l'automate, il y a donc dans chaque puits des complexes hybrides ARN/ADNc. 175 µL d'eau Milli Q sont ajoutés dans chaque puits afin de diluer les solutions d'ADNc.

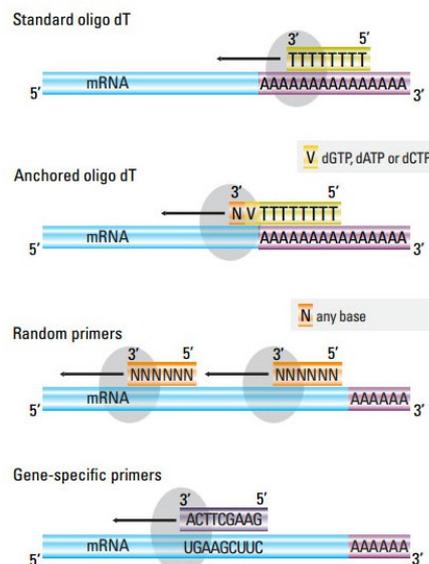


Figure 3 : Principe de la Transcription Inverse

5. Réaction de Polymérisation en Chaîne quantitative (qPCR)

Cette analyse permet de mesurer l'expression des gènes de manière spécifique grâce à des amorces spécifiques de chaque gène à quantifier. Dans chaque puits, 5µL de l'ADNc à amplifier seront mis en présence de 10µL de Mix PCR 2X contenant l'enzyme Taq polymérase, 1µL de primers (ou amorces) Reverse et Forward à 6 µM, et 4µL d'eau Milli Q. 15µL de solutions seront donc ajoutés aux 5µL d'ADNc. Pour simplifier la manipulation, un prémix est préparé, dans lequel chaque volume est multiplié par 100 et 15µl sont distribués dans chaque puits. Pour déterminer l'efficacité de la PCR, une gamme composée d'ADNc obtenus à partir d'ARN de différents tissus (foie et muscle) est ajoutée dans la plaque . Pour utiliser la gamme d'étalonnage, on la place, avec des doublons, dans 5 puits, en dilutions en cascade de raison 4.

La plaque est ensuite placée dans l'automate StepOnePlus d'Applied Biosystems, qui va tout d'abord la chauffer à 95°C pendant 20 secondes afin d'activer la Taq polymérase pour la qPCR. Ensuite, 40 cycles de PCR vont être réalisés (dénaturation à 95°C pendant 3 secondes, puis élongation à 60°C pendant 30 secondes, pendant laquelle les amorces vont s'hybrider aux ADN matrices et la Taq polymérase va synthétiser le brin complémentaire).

La quantification en qPCR se fait ici grâce à un agent fluorescent : le SyberGreen. Au cours de chaque cycle ce fluorochrome se fixe à l'ADN double brin ce qui permet de quantifier l'ADN présent dans chaque puits à chaque cycle par mesure de la fluorescence émise (Figure 4). Il y a donc une augmentation de la fluorescence proportionnelle à la quantité d'ADN produit. En fin de réaction, le logiciel fournit 3 types de courbes : la courbe d'amplification, la courbe standard et la courbe de fusion. La courbe d'amplification indique la fluorescence émise au cours des 40 cycles de PCR. Le logiciel définit une valeur seuil que doit atteindre la fluorescence. Le nombre de cycles nécessaire pour atteindre cette valeur, c'est à dire le cycle seuil, noté Ct (Cycle threshold) est reporté sur la courbe standard. La courbe de fusion est réalisée en chauffant progressivement les échantillons de 65 à 90°C, tout en mesurant la fluorescence. Lorsque les 2 brins se séparent la fluorescence chute. La dérivée de cette courbe donne la courbe de fusion, où un pic correspond spécifiquement à chaque produit de PCR. La courbe standard est réalisée dans un graphique qui fait intervenir le nombre de CT en fonction du logarithme de la quantité d'ADN initiale. Grâce à cette droite, l'efficacité de la qPCR est calculé par la formule :

$$E = [(10^{-1/a}) - 1] \times 100 \quad a : \text{pente de la droite}$$

Une efficacité de 1 (ou 100%) signifie que la quantité d'ADN double à chaque cycle.

SYBR® GREEN I DYE ASSAY CHEMISTRY

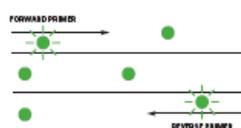
1. **Reaction setup:** The SYBR® Green I Dye fluoresces when bound to double-stranded DNA.



2. **Denaturation:** When the DNA is denatured, the SYBR® Green I Dye is released and the fluorescence is drastically reduced.



3. **Polymerization:** During extension, primers anneal and PCR product is generated.



4. **Polymerization completed:** When polymerization is complete, SYBR® Green I Dye binds to the double-stranded product, resulting in a net increase in fluorescence detected by the 7900HT system.

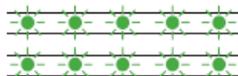


Figure 4 : Principe de l'analyse par qPCR

Afin de corriger les éventuelles variations induites par les pipettages et/ou l'efficacité des RT, l'expression du gène eF1 α est mesurée. Si son expression est constante, l'ensemble des données de qPCR est normalisée par eF1 α (rapport gène d'intérêt/eF1 α).

F. Analyses statistiques

Les données obtenues par PCR en temps réel ont été traitées par une analyse de variance à deux facteurs (Traitement et temps) suivie d'un test posthoc de Tukey pour déterminer si les effets dus à la lésion étaient significatifs. Une p-value inférieure à 0,05 est considérée comme significative.

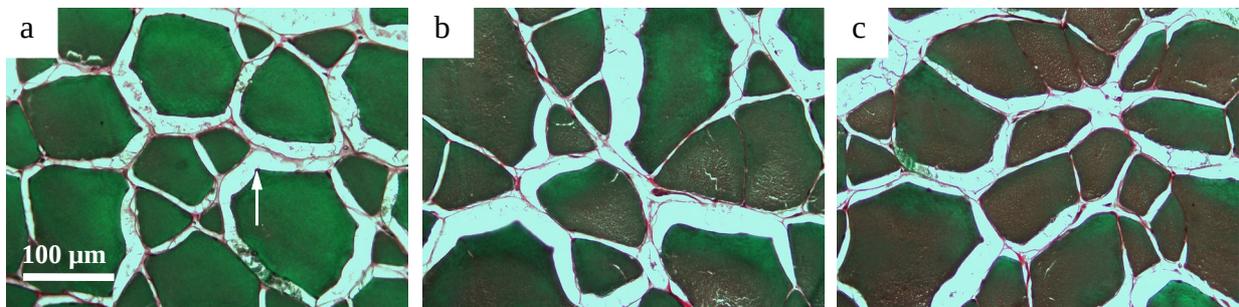
L'ensemble des tests a été réalisé à l'aide du logiciel R 3.1.1-1

II. Résultats

A. Description histologique de la régénération musculaire

L'objectif en histologie était de colorer les coupes afin d'observer la mise en place puis l'évolution de la régénération musculaire, d'un point de vue phénotypique.

Tout d'abord il a fallu déterminer le temps optimal de coloration des coupes. Avec 4 minutes de coloration, les fibres sont bien colorées en vert grâce au colorant de Rojkind, les noyaux sont bien visibles en périphérie de ces fibres, et le collagène est correctement coloré en rouge (Figure 5a). Avec 6 minutes de coloration, les fibres sont plus foncées, en partie marron, ce qui fait que les noyaux sont moins visibles (Figure 5b). Finalement, avec 10 minutes de coloration, les fibres sont en grande majorité marrons et les noyaux ne sont pas visibles (Figure 5c). Les tests ont donc montré qu'au dessus de 4 minutes de coloration, le Rouge Sirius était trop présent et les fibres devenaient marron, et ce à cause de la superposition des 2 colorants. Un temps de coloration de 4 minutes est donc choisi.



Figures 5 : Observation au microscope optique (X200), de muscle de truite coloré au colorant de Rojkind et hématoxyline de Weigert à différents temps d'incubation. La flèche indique un noyau de fibre musculaire

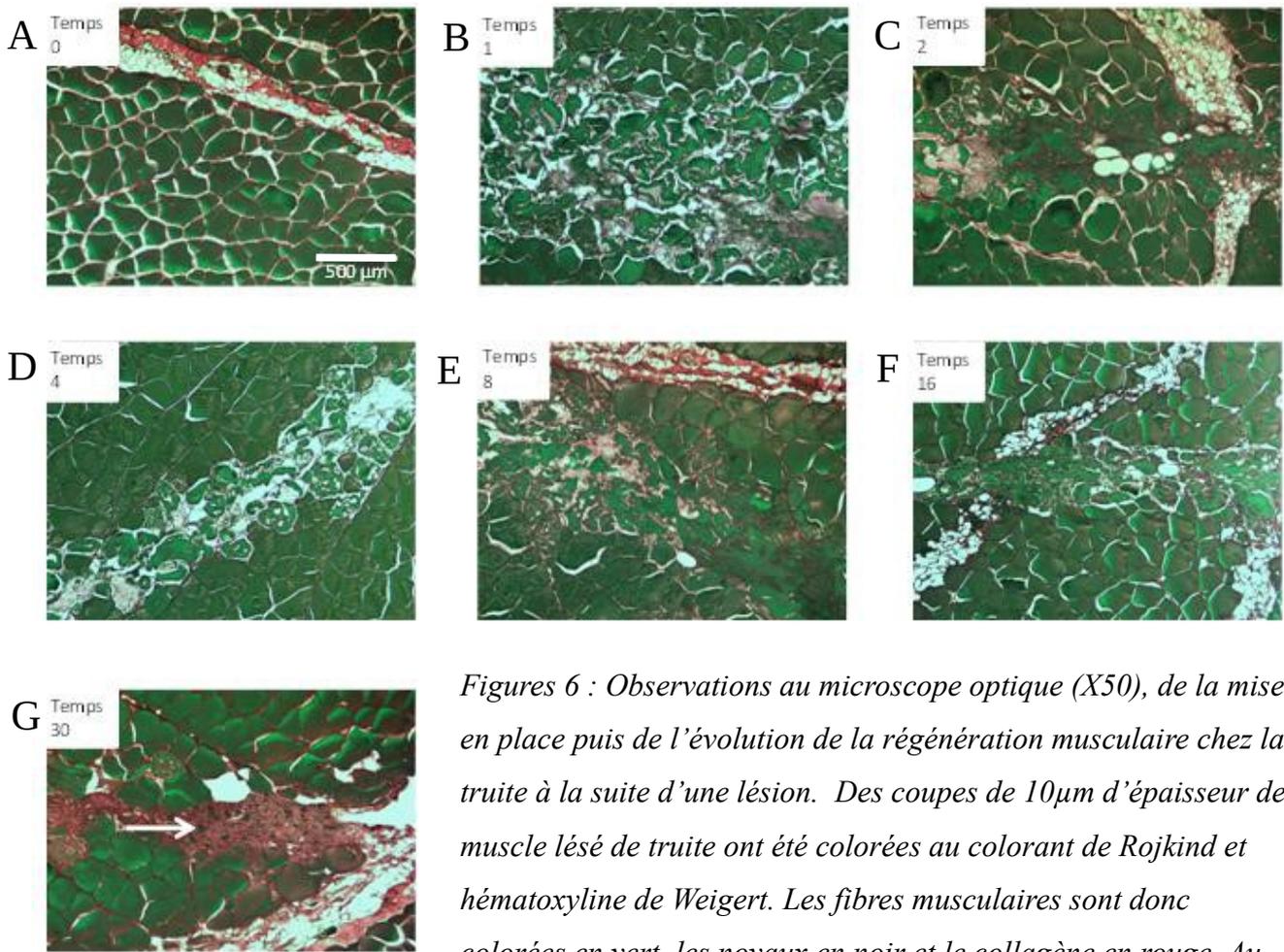
Chez les animaux contrôles (Figure 6a), des fibres musculaires intactes sont observées. Chaque fibre est bien colorée en vert et quelques noyaux colorés en noirs sont observables à la périphérie de certaines fibres. Le collagène lui est bien coloré en rouge, il est bien visible au niveau du myosepte qui en est partiellement composé. Un espace entre les fibres est observé, celui-ci est dû à la déshydratation qui a fait que ces fibres se sont légèrement rétractées.

Au jour 1 (Figure 6b), la piqûre a entraîné la destruction des fibres musculaires qui sont donc lésées et qui commencent à dégénérer.

Les Figures 6c à 6f (jour 2 à jour 16) montrent des cellules ovoïdes mononucléées apparues en grand nombre. Ces cellules mononucléées pourraient être des macrophages présents afin de digérer les fibres lésées, ou alors elles pourraient simplement être des hématies, qui sont nucléées chez le poisson. Les fibres musculaires lésées sont également grandement dégradées et la structure du muscle est profondément altérée.

Au jour 30 (Figure 6g), les cellules mononucléées observées précédemment ne sont plus présentes. L'espace laissé par la disparition des anciennes fibres a été comblé par du tissu conjonctif composé de fibroblastes. Cependant, de petites cellules vertes sont présentes, et semblent de plus comporter 1 ou 2 noyaux.

Pour démontrer que ces petites cellules correspondent à des fibres nouvellement formées, une immunofluorescence avec un anticorps anti-myosine spécifique du muscle a été réalisée. A l'observation au microscope optique à fluorescence (Figure 7), des cellules de petite taille et fortement fluorescentes sont observées au sein de la zone de régénération, démontrant que ces cellules sont donc composées de myosine. De plus, grâce au colorant Hoechst qui colore les noyaux, il est possible d'affirmer qu'il y a présence d'un ou plusieurs noyaux au centre de ces cellules. L'immunofluorescence permet donc de confirmer que les cellules observées sur les coupes prélevées au jour 30 sont bien de nouvelles fibres.



Figures 6 : Observations au microscope optique (X50), de la mise en place puis de l'évolution de la régénération musculaire chez la truite à la suite d'une lésion. Des coupes de 10µm d'épaisseur de muscle lésé de truite ont été colorées au colorant de Rojkind et hématoxyline de Weigert. Les fibres musculaires sont donc colorées en vert, les noyaux en noir et le collagène en rouge. Au temps 30, la flèche indique une fibre musculaire nouvellement formée par hyperplasie.

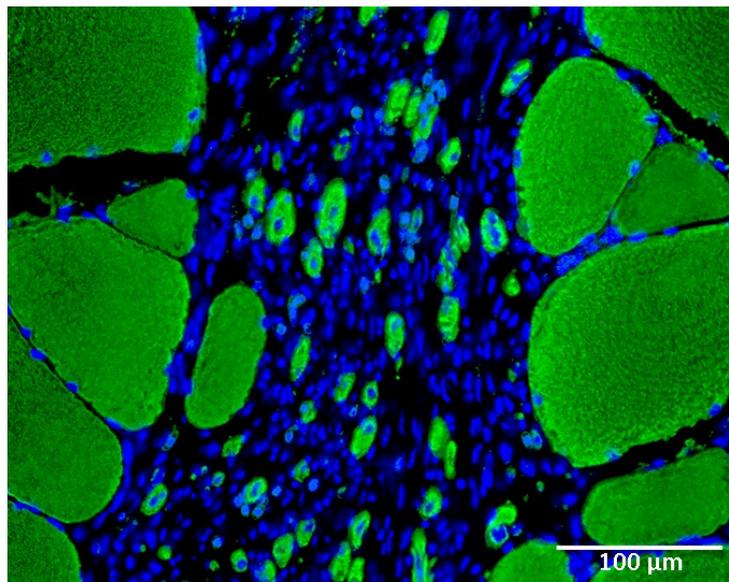
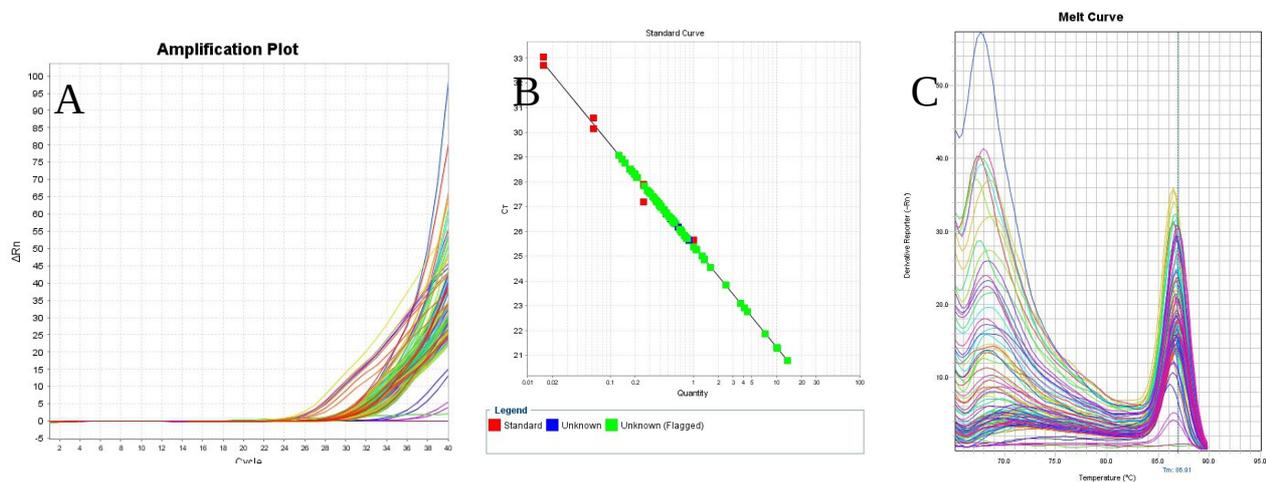


Figure 7 : Observation par immunocytofluorescence anti-myosine d'une coupe de muscle lésé de truite après 30 jours de régénération, microscope optique à fluorescence, (X200)

B. Analyse expressionnelle de gènes lors de la régénération musculaire

L'objectif des analyses qPCR était de suivre l'expression des gènes sélectionnés au cours de la régénération. Pour chaque gène, la droite standard permet de calculer l'efficacité de la qPCR (Figure 8b), tandis que la courbe de fusion permet de vérifier qu'il n'y a eu qu'un seul amplicon (Figure 8c) en voyant qu'il n'y a qu'un seul pic, le premier étant dû au kit PCR et ne représentant que du bruit de fond. La courbe d'amplification permet de voir la fluorescence émise au cours des 40 cycles (Figure 8a). Pour l'ensemble des gènes analysés, il n'a été observé qu'un seul pic de fusion et une efficacité de 80-100%, ce qui valide ainsi les analyses effectuées par qPCR. Par ailleurs, l'expression du gène eF1 α n'est pas significativement modifiée au cours de la régénération, nous avons donc pu utiliser son expression pour réaliser la normalisation.



Figures 8 : Courbes obtenues avec l'automate à l'issue de qPCR.. En A : courbe d'amplification, en B : courbe standard, en C : courbe de fusion

L'ensemble des résultats a été mis sous forme de graphiques afin de voir l'expression de chaque gène en fonction du temps (Figures 9).

Pendant les 16 premiers jours, la lésion du muscle ne modifie pas significativement l'expression de Myogénine et de Myomaker. Par contre, 30 jours après la lésion, leur expression a fortement augmentée (Figures 9b et 9c).

L'expression du gène Mcadhérine augmente progressivement pendant 2 jours pour atteindre un premier pic au jour 8, puis elle va diminuer significativement jusqu'au jour 16 avant d'augmenter une seconde fois au jour 30 (Figure 9d).

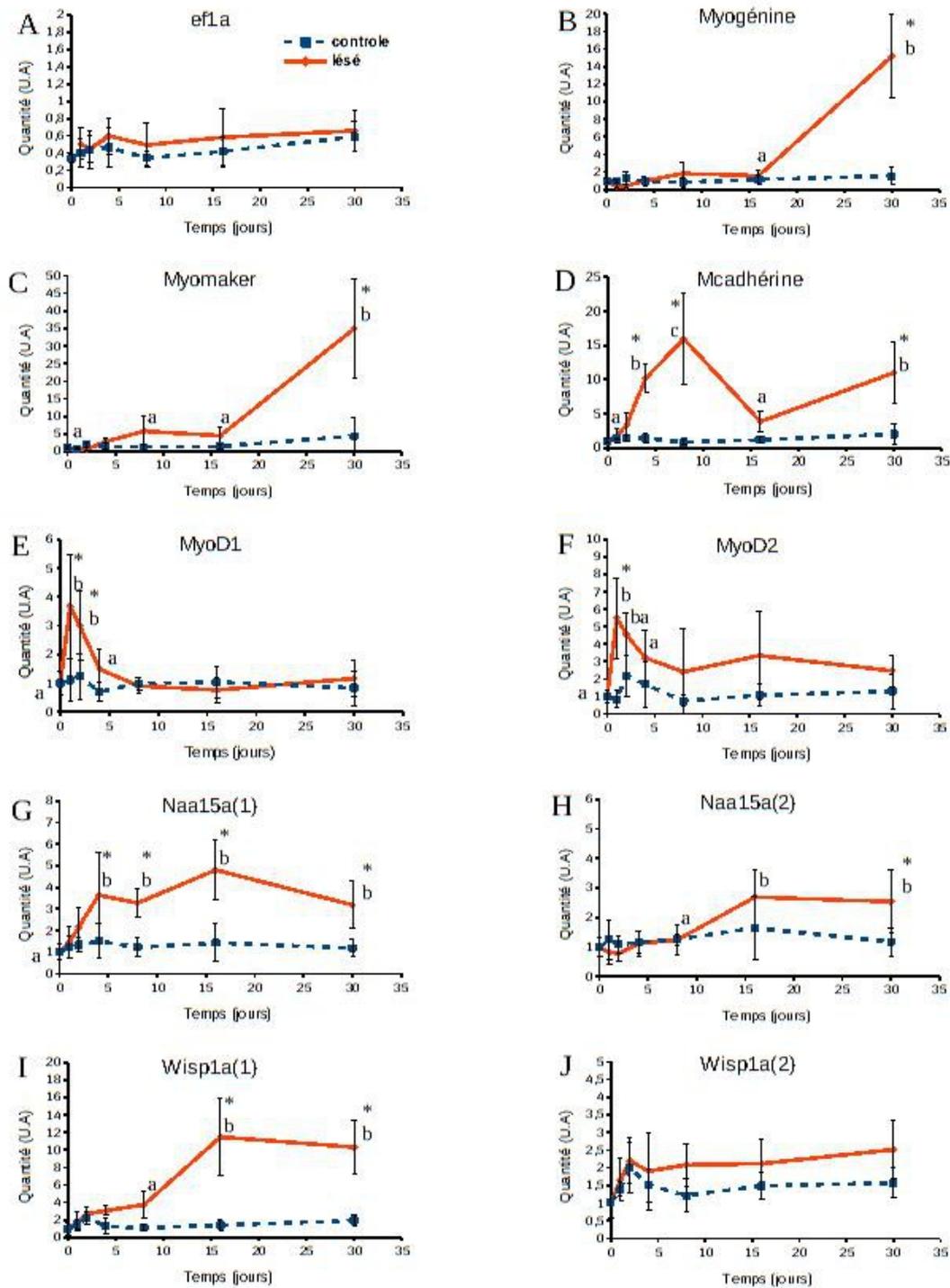
Les gènes MyoD1 et MyoD2 ont une expression presque 3 fois supérieure au contrôle dès le lendemain de la lésion, puis par la suite leur expression va diminuer (Figures 9e et 9f). C'est à dire que MyoD1 a une expression qui a diminuée jusqu'au jour 8 et qui devient équivalente à l'expression des contrôles, et MyoD2 a une expression qui a diminué de moitié jusqu'au jour 8 mais qui reste légèrement plus élevée que les contrôles tout au long de l'expérimentation.

Le gène Naa15a(1) a une expression comparable à celle des contrôles jusqu'au jour 2. Au jour 4, l'expression de ce gène a augmentée de manière significative par rapport au contrôle. L'expression de Naa15a(1) reste significativement plus élevée chez les animaux lésés, et ce jusqu'au jour 30 (Figure 9g).

L'expression du gène Naa15a(2) reste stable durant 8 jours et va rester aux mêmes valeurs que les contrôles. Puis elle va augmenter au jour 16 et va se stabiliser pour être significativement supérieure à l'expression du contrôle au jour 30 (Figure 9h).

L'expression du gène Wisp1a(1) augmente à partir du jour 16 et stagne jusqu'au jour 30. Sur ces 2 derniers points, cette expression du gène Wisp1a(1) est supérieure aux contrôles de façon significative (Figure 9i).

L'expression du gène Wisp1a(2) n'est pas significativement modifiée au cours de la régénération. En effet la Figure 9j montre que le gène ne s'exprime à aucun moment de manière significative par rapport aux contrôles.



Figures 9 : Cinétiques d'expression des gènes lors de la régénération musculaire suite à une lésion.

Le muscle axial de poissons a été lésé par piqûre, puis des échantillons ont été prélevés à différents temps, ainsi que des échantillons contrôles, de muscle non lésé. L'expression des gènes a été mesurée par PCR en temps réel et normalisé avec le niveau d'expression de eF1a. Des lettres différentes indiquent que les moyennes sont significativement différentes. Un astérisque indique que les moyennes à ce temps de prélèvement sont significativement différentes.

III. Discussion

Afin d'étudier les gènes impliqués dans la fusion des myocytes lors de la régénération musculaire, ainsi qu'étudier topographiquement la mise en place puis l'évolution de cette régénération, des poissons ont été lésés par piqûre au niveau du muscle dorsal. Des échantillons de muscle ont été prélevés à différents temps pour être coupés et colorés dans le but d'une observation microscopique, ou bien pour être broyés afin d'extraire les ARN totaux dans le but de quantifier l'expression de certains gènes par qPCR.

A. Description histologique

Les observations des coupes de muscle de poisson ont donc finalement permis de confirmer que les fibres musculaires ont été complètement détruites par la lésion. En effet à l'endroit de la piqûre, les fibres ont totalement dégénéré pour finalement disparaître. De plus, la zone lésée est infiltrée par des cellules mononucléées ayant déjà été recensées, qui peuvent correspondre à des hématies et/ou des macrophages (Rowlerson et al 1997). Suite à la disparition de ces fibres lésées, la mise en place d'un tissu conjonctif composé de fibroblastes a été observée. Après ces 30 jours faisant suite à la lésion, il y a présence de cellules vertes, donc colorées de la même façon que les fibres musculaires, comportant un ou plusieurs noyaux colorés en noir en leur centre. L'immunocytofluorescence a permis de confirmer que les cellules observées précédemment expriment la protéine myosine qui est un composant fondamental des fibres musculaires. De plus, la coloration Hoescht a une fois de plus mis en avant la présence de noyaux centraux, spécifiques des fibres nouvellement formées. En effet, lorsque des myocytes fusionnent, leurs noyaux migrent vers la périphérie de la nouvelle fibre tardivement. Le fait que les noyaux soient au centre confirme donc que ces cellules sont des fibres nouvellement formées puisque c'est un phénomène caractéristique d'une fusion récente des myocytes (Folker et al, 2013). Les résultats confirment que la régénération musculaire se déroule en plusieurs étapes. A la suite de la destruction des fibres lésées, de nouvelles fibres sont nouvellement formées par hyperplasie, puis celles-ci grossissent ensuite par hypertrophie. L'ensemble de ces observations confirme que le protocole expérimental mis en œuvre a permis d'induire une régénération musculaire. Il est donc possible de mesurer l'expression de gènes durant ce processus.

B. qPCR

Plusieurs gènes impliqués dans la myogénèse ont été étudiés : MyoD, Mcadherine, Myomaker et Myogénine (Rescan et al, 1995) (Rescan et al, 2011) (Millay et al, 2014). L'expression de ces deux derniers gènes augmente au trentième jour, ce qui correspond au moment de la formation des nouvelles fibres musculaires observées en histologie. MyoD s'exprime environ 3 fois plus que le contrôle à 48h puis son expression diminue ensuite pour finalement être similaire aux contrôles. Or MyoD est un gène qui s'exprime précocement, en amont des autres facteurs car c'est lui qui va induire l'augmentation de l'expression des autres gènes impliqués dans la myogénèse (Tanaka et al, 2008), ce qui est donc cohérent puisqu'il s'exprime avant tout autre gène. Il existe deux pics d'expression de la Mcadhérine à 8 et 30 jours. Le premier pic d'expression du gène Mcadhérine n'a jamais été reporté, mais en revanche il a déjà été observé au sein de l'équipe Croissance et Qualité de la Chair au LPGP de l'INRA Rennes, lors d'une expérimentation "jeûne-réalimentation". L'expression précoce de MyoD, puis les expressions des gènes Myomaker, Myogénin et Mcadhérine par la suite, en concordance avec le moment d'apparition de nouvelles fibres musculaires en histologie, permet de confirmer qu'il y a bien eu une néo-myogénèse. Ce qui permet d'étudier les gènes nouvellement identifiés comme gènes impliqués dans la fusion des myocytes : Naa15a et Wisp1a.

Les deux gènes Naa15a et Wisp1a ont été identifiés par l'équipe comme étant nécessaire à la fusion des myocytes *in vitro*, grâce à une inactivation ayant entraîné un défaut de fusion. Chez la truite, il en existe 4 du fait de la duplication du génome (Berthelot et al, 2014). Cependant ces gènes étant nouvellement identifiés, aucune donnée n'existe à leur sujet et leur régulation en situation physiologique est totalement inconnue. Ici les gènes Naa15a(2) et Wisp1a(1) ne s'expriment pas de manière significative par rapport au contrôle jusqu'au jour 8, puis leur expression augmente au jour 16 et stagne jusqu'au jour 30. Ces gènes s'activent donc postérieurement à MyoD, mais avant l'augmentation de myogénine et la formation des nouvelles fibres. Ces cinétiques d'expression confirment l'hypothèse selon laquelle Naa15a et Wisp1a sont bien impliqués dans la myogénèse, lors de la fusion des myocytes. L'hypothèse suivante peut donc être émise, ces gènes sont impliqués dans les étapes précoces de la régénération (migration, reconnaissance, adhésion des cellules satellites...).

IV. Conclusion

Les résultats d'observation histologique ont permis de confirmer que l'expérimentation s'est déroulée comme il était souhaité. En effet la lésion par piqûre a bien entraîné la destruction de fibres musculaires, puis la mise en place d'une régénération musculaire. L'apparition de nouvelles petites fibres formées par hyperplasie a été confirmée.

La confirmation d'une régénération musculaire a donc permis de continuer l'expérimentation en réalisant une cinétique d'expression de différents gènes impliqués dans la myogénèse par qPCR. Ces cinétiques ont confirmé l'expression de ces gènes et ont donc par là même confirmé qu'il y a bien eu un phénomène de myogénèse. L'objectif principal de cette expérimentation était d'étudier l'expression de gènes identifiés comme impliqués dans la fusion des myocytes. Les cinétiques de ces gènes *Naa15a* et *Wisp1a* suggèrent fortement qu'ils sont impliqués dans la myogénèse, et plus précisément dans les premières étapes de la fusion (migration, reconnaissance...). Il faudrait désormais savoir précisément lors de quelle étape de cette fusion ces facteurs sont actifs. En effet, le fait d'avoir confirmé leur implication dans la myogénèse ne permet pas de savoir si ils sont acteurs lors des proliférations de myoblastes ou de myocytes, lors de la différenciation des myoblastes en myocytes, lors de la migration des myocytes, ou encore lors de la fusion des myocytes entre eux ou avec des fibres existantes. Il faudrait alors désormais étudier plus en précision l'étape pendant laquelle ces gènes s'expriment, afin de connaître plus précisément leur rôle lors de la myogénèse et de comprendre exactement leur fonction.

Bilan personnel

Ce stage en laboratoire était pour moi l'occasion d'apprendre réellement ce qu'est le métier de technicien de laboratoire dans la recherche. Les secteurs de la physiologie et de la génomique sont parmi ceux qui m'intéressent le plus et c'est avec une grande motivation que je me suis investi. L'accueil au sein de l'équipe s'est très bien passé et j'ai pu m'intégrer avec beaucoup de facilité, ce qui m'a grandement aidé puisqu'il m'a été plus facile de demander informations et conseils afin de bien comprendre toutes les tâches que j'ai pu effectuer. Les activités qui m'ont été confiées ont été nombreuses et variées. J'ai donc pu m'intéresser à plusieurs techniques différentes. J'ai ainsi pu appliquer mes acquis théoriques ou pratiques dans une étude en autonomie, ce qui m'a apporté des connaissances aussi bien scientifiques que professionnelles. J'ai également pu constater que le secteur de la recherche est totalement différent du secteur médical. En effet j'ai pu régulièrement constater que les manipulations ne fonctionnent pas toujours comme espéré, que le technicien de laboratoire de recherche varie beaucoup ses activités et qu'un projet se fait en équipe et non individuellement. Cette formation va me servir dans la suite de mon parcours puisque je souhaite continuer dans la biologie et les sciences animales. Mon objectif professionnel étant de devenir vétérinaire, je sais désormais que le domaine de la recherche pourrait également se présenter comme un parcours dans lequel je pourrais m'orienter. C'est donc enrichi que je termine ce stage de fin de diplôme.

Bibliographie

- Alami-Durante,H., Bugeon,J., Deschamps,M.H., Gabillard,J.C., Lefèvre,F., Meunier,F., Rescan,P.Y., Sire,J.Y., and Weil,C. (2010) « Croissance squelettique et musculaire. In : La truite arc-en-ciel » *De la biologie à l'élevage*, pp.137-157. Ed Quae, Versailles
- Berthelot C, Brunet F, Chalopin D, Juanchich A, Bernard M, Noël B, Bento P et al. 2014. « The rainbow trout genome provides novel insights into evolution after whole-genome duplication in vertebrates » *Nature Communications*, Vol 5, doi:10.1038/ncomms4657
- Colston J, De la Rosa S, Koehler M, Gonzales K, Mestril R, Freeman G, Bailey S, et Chandrasekar B. 2007. « Wnt-Induced Secreted Protein-1 Is a Prohypertrophic and Profibrotic Growth Factor ». *AJP: Heart and Circulatory Physiology*, Vol 293 (n°3), pp.H1839-H1846.
- Folker, Eric S. and Baylies, Mary K., 2013. « Nuclear positioning in muscle development and disease ». *Frontiers in Physiology* Vol 4, Art 363
- Millay, Douglas P., Lillian B. Sutherland, Rhonda Bassel-Duby, et Eric N. Olson. 2014. « Myomaker Is Essential for Muscle Regeneration ». *Genes & Development* Vol 28 (n°15), pp.1641-1646.
- Rescan PY, Gauvry L, Paboeuf G. 1995. « A gene with homology to myogenin is expressed in developing myotomal musculature of the rainbow trout and in vitro during the conversion of myosatellite cells to myotubes ». *FEBS Letters* Vol 362, pp.89-92
- Rescan PY. 2008. « New insights into skeletal muscle development and growth in teleost fishes » *Journal of Experimental Zoology, Part B: Molecular and Developmental Evolution*, Vol 310, pp. 541-548

- Rescan PY, Ralli re C, Lebret V. 2011. « N-cadherin and M-cadherin are sequentially expressed in myoblast populations contributing to the first and second waves of myogenesis in the trout ». *Journal of Experimental Zoology, Part B: Molecular and Developmental Evolution*, Vol 318, pp. 71-77
- Rescan PY, Ralli re C, Lebret V, Fretaud M. 2015. « Analysis of muscle fibre input dynamics using a myog:GFP transgenic trout model ». *The Company of Biologists Ltd - The Journal of Experimental Biology*, Vol 218, pp.1137-1142
- Rowlerson, A., G. Radaelli, F. Mascarello, et A. Veggetti. 1997. « Regeneration of skeletal muscle in two teleost fish: Sparus aurata and Brachydanio rerio ». *Cell and tissue research* Vol 289 (n 2), pp.311-322.
- Tanaka Y, Yamaguchi A, Fujikawa T, Sakuma K, Morita L and Ishii K. 2008. « Expression of mRNA for specific fibroblast growth factors associates with that of the myogenic markers MyoD and proliferating cell nuclear antigen in regenerating and overloaded rat plantaris muscle ». *Acta Physiol*, Vol 194, pp.149-159

Résumé

Le muscle est constitué de myofibrilles qui possèdent une capacité remarquable de croissance et régénération. Cette capacité nécessite un type particulier de cellules souches : les cellules satellites. Celles-ci génèrent des précurseurs musculaires (myoblastes) qui vont proliférer en myocytes et fusionner, soit avec des fibres existantes : phénomène d'hypertrophie où la fibre grossit, soit entre eux : phénomène d'hyperplasie où il y a formation de nouvelles fibres.

L'identification de gènes impliqués dans la fusion des myocytes (Naa15a et Wisp1a) a été effectuée. L'objectif de mon stage est de caractériser la cinétique d'expression de ces gènes et l'évolution de la régénération des fibres musculaires d'un point de vue phénotypique, et ce en mesurant l'expression de ces gènes par qPCR et en observant au microscope des fibres musculaires lésées, à différents temps d'avancement de la régénération.

Nos résultats montrent que les fibres détruites dégénèrent pendant 16 jours, puis qu'après leur disparition de nouvelles fibres sont formées par hyperplasie. Les gènes étudiés quant à eux, s'expriment à partir du 16^{ème} jour et continuent de s'exprimer de plus en plus.

En conclusion, nos résultats montrent que lors d'une lésion du muscle chez le poisson, celui-ci se régénère par formation de nouvelles fibres. Ces résultats permettent également de confirmer l'implication des gènes nouvellement identifiés dans la fusion des myocytes.

Abstract

The muscle is composed of myofibrils, having a remarkable growth and regeneration capacity. This capacity requires a particular type of stem cells : the satellite cells. These cells generate muscular precursors (myoblasts) that will proliferate in myocytes and merge, either with existing fibers : hypertrophy phenomenon in which the fiber grows, or with other myocytes : hyperplasia phenomenon in which new fibers are formed.

The identification of genes involved in the merge of myocytes (Naa15a and Wisp1a) was carried out. My purpose in this internship was to characterize the kinetics of expression of these genes and the fibers regeneration evolution in a phenotypic point of view, by measuring these genes expression by qPCR and by observing under a microscope some muscular injured fibers, at different times of completion of the regeneration.

Our results show that destroyed fibers degenerate during 16 days, and that after their disappearance, new fibers are formed by hyperplasia. Studied genes express themselves from day 16 and keep expressing more and more.

In conclusion, our results show that during a muscle injury in fish, the muscle regenerates by new fibers formation. These results allow to confirm the implication of the new identified genes in the merge of myocytes.