

# Influence du type de muscle squelettique sur les propriétés des cellules satellites en culture primaire chez le porc

Marie-Hélène PERRUCHOT (1), Patrick ECOLAN (1), Inge Lise SØRENSEN (2), Niels OKSBJERG (2), Louis LEFAUCHEUR (1)

(1) INRA, UMR 1079 SENAH, F-35590 Saint-Gilles, France

(2) University of Aarhus, Dept. Food Science, DK-8830 Tjele, Denmark

marie-helene.perruchot@rennes.inra.fr

## Properties of satellite cell cultures originating from different pig skeletal muscles

Skeletal muscle fibres exhibit a large range of phenotypes that are characterized by various morphological, biochemical and functional properties. However, whether satellite cells from different fibre types have different properties remains controversial, depending on the type of protein studied, the culture conditions, and the animal species considered. The aim of the present study was to determine whether satellite cells originating from two different pig muscles exhibit different proliferation, differentiation and maturation properties when cultured in the same environment. Satellite cells were harvested from the *Longissimus* (LM, 7% type I fibres) and *Rhomboideus* (RM, 63% type I fibres) muscles of 6-week old Large White x Pietrain piglets. Similar amounts of satellite cells per gram of fresh muscle were obtained from both muscles. Satellite cells were seeded, let to proliferate up to 80% confluence, and then induced to differentiate for 4 days. BrDU incorporation after 2 days of culture (P2) showed similar proliferation rates between muscles, and confluence was achieved after 7 days of culture in both muscles. More than 90% of the cells were desmin positive after P5. Fusion index after 4 d of differentiation reached more than 60%. The Myosin Heavy Chain (MyHC) antibody MF20 stained 20% of the mononucleated cells at P5, and strongly labelled myotubes during differentiation. MyHCs electrophoresis showed that satellite cells in culture did not express the adult isoforms I, IIA, IIX and IIB, but only the embryonic and fetal MyHC isoforms. Therefore, no difference between satellite cells originating from different pig skeletal muscles could be found in our experimental conditions.

## INTRODUCTION

Les cellules satellites, situées entre la membrane basale et le sarcolemme des fibres musculaires, peuvent proliférer et fusionner avec les fibres musculaires adjacentes. Elles sont impliquées dans la croissance des fibres musculaires et les phénomènes de régénération. Les fibres musculaires des muscles squelettiques présentent des caractéristiques morphologiques, biochimiques, physiologiques et fonctionnelles différentes, et il est établi que la composition des muscles en fibres musculaires influence la qualité de la viande (Lefaucheur, 2009). L'existence de différences intrinsèques entre les cellules satellites associées à différents types de fibres et l'implication de ces cellules dans la détermination des caractéristiques contractiles et métaboliques des fibres sont controversées en fonction des protéines analysées, des conditions de culture et des espèces considérées.

Le but de cette étude est de déterminer *in vitro* si les cellules satellites isolées à partir de deux muscles de porc de composition en fibres différente possèdent les mêmes propriétés de prolifération, de différenciation et de maturation.

## 1. MATÉRIELS ET MÉTHODES

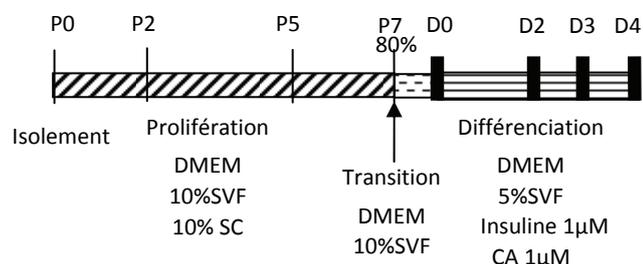
### 1.1. Composition en fibres musculaires

L'étude est réalisée sur les muscles *Longissimus* (LM) et *Rhomboideus* (RM) issus de 5 porcelets femelles Piétrain X Large White âgés de 6 semaines. Des échantillons de muscle sont prélevés dans le sens des fibres et congelés dans de l'isopentane refroidi par de l'azote liquide, puis stockés à -80°C jusqu'aux analyses. Les fibres musculaires sont typées par histoenzymologie sur des coupes transversales sériées de 10µm réalisées au cryostat à -20°C. Une coupe est colorée en révélant l'activité de la mATPase après préincubation à pH 4.35 pour identifier les fibres de type I, IIA et IIB (Brooke et Kaiser, 1970). Une coupe sériée est réalisée pour révéler l'activité de la succino-déshydrogénase (SDH) et classer les fibres selon leur type métabolique (Nachlas *et al.*, 1957).

### 1.2. Isolement et culture des cellules satellites

Immédiatement après l'abattage, les cellules sont isolées à partir des deux muscles selon la technique décrite par Theil *et al.* (2006). Les muscles frais sont récupérés dans du PBS-glucose (1%), émincés puis mis à digérer pendant 1 heure dans

un mélange composé de trypsine 0,25%/collagénase de type II 1,5mg.ml<sup>-1</sup>/DNase 0,1%. Les digestats sont ensuite filtrés sur membrane de nylon 200µm puis 50µm. Une centrifugation sur gradient de Percoll à 20% permet un enrichissement en cellules satellites. Les cellules sont ensemencées sur Matrigel à raison de 7. 10<sup>4</sup> cellules/cm<sup>2</sup> en plaque 6 puits (35 mm).



**Figure 1** : Cinétique de culture cellulaire en prolifération (P), puis en différenciation (D). Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), sérum de veau fœtal (SVF), sérum de cheval (SC), cytosine arabinoside (CA).

La prolifération cellulaire est mesurée à P2 par incorporation de BrdU. A tous les temps, les cellules sont fixées au méthanol à -20°C puis marquées avec les anticorps anti-Desmine (Sigma) et anti-MyHC (chaîne lourde de myosine ; MF20, Sigma). Les noyaux sont marqués en bleu au DAPI. Le pourcentage de fusion au cours de la différenciation est mesuré en comptant le pourcentage de noyaux inclus dans des structures polynucléées marquées par MF20. Les muscles prélevés *in vivo* ainsi que les cellules récupérées aux différents stades de la culture sont lysés dans du Laemli puis déposés sur gel d'acrylamide à 8% (Talmadge et Roy, 1993). Cette électrophorèse permet la séparation des différentes isoformes de MyHC (embryonnaire, fœtale, rapides et lente) et leur quantification après coloration au bleu de Coomassie colloïdal. Les effets du type de muscle, du stade de culture et leur interaction ont été étudiés par analyse de variance à l'aide de la procédure GLM de SAS.

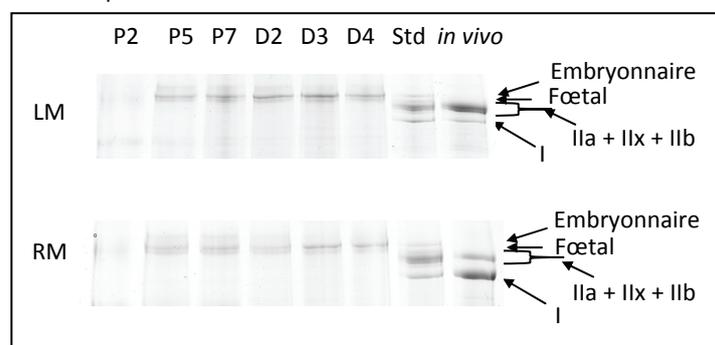
## 2. RÉSULTATS ET DISCUSSION

*Ex vivo*, les pourcentages des fibres I, IIA et IIB sont respectivement de 10, 15 et 75% dans le LM et 70, 15 et 15% dans le RM ; ces résultats combinés avec ceux de la coloration SDH confirment à nouveau les différences entre les deux muscles, le LM étant à contraction rapide et métabolisme essentiellement glycolytique, et le RM à contraction lente et métabolisme majoritairement oxydatif.

*In vitro*, Le rendement d'isolement cellulaire est identique entre les deux muscles (1,5 10<sup>6</sup> cellules/g de muscle frais). Les mesures d'incorporation de BrDU à P2 montrent qu'il n'y a pas de différence de prolifération entre les cellules selon le muscle

d'origine. L'immunomarquage de la desmine montre que plus de 90% des cellules sont marquées à P5 et ce pourcentage augmente à P7 (P < 0,001). Ainsi, les cellules isolées sont très majoritairement myogéniques et ce sans différence significative entre les deux muscles. L'immunomarquage des MyHC montre que dès P5 plus de 20% des cellules mononucléées sont marquées, ce qui est en accord avec les données d'électrophorèse montrant la présence de MyHC à P5 (Fig. 2). L'index de fusion augmente au cours de la différenciation pour atteindre 65% à D4, sans différence entre LM et RM.

Les électrophorèses montrent que seules les MyHC adultes de type I, IIA, IIX et IIB sont présentes *ex vivo*. En revanche, elles sont absentes dans les cellules en culture et ce quel que soit le muscle. Seules les formes embryonnaires et fœtales de MyHC sont présentes en culture alors qu'elles sont absentes *ex vivo* dans les deux muscles à ce stade. Le rapport MyHC embryonnaire/ MyHC fœtale est très variable entre animaux et n'évolue pas de manière coordonnée au cours de la culture.



**Figure 2** : Electrophorèse des chaînes lourdes de la myosine (MyHC) dans les muscles LM et RM *in vivo* et au cours de la culture de P2 à D4. Le standard (Std) est un mélange de muscles LM et RM post-nataux avec du LM fœtal.

## CONCLUSION

Dans nos conditions de culture, les cellules satellites n'expriment pas de formes de MyHC adultes, ce qui indique qu'elles ne reflètent pas le profil des muscles auxquels elles sont associées. En revanche, elles expriment les MyHC embryonnaires et fœtales, mimant ainsi les étapes de la myogenèse. Par ailleurs, les cellules satellites extraites des muscles LM et RM possèdent les mêmes niveaux de prolifération, d'index de fusion et de composition en MyHC, suggérant que ces cellules sont identiques dans les deux muscles et constituent une population homogène. Ainsi, les différences de composition en type de fibres entre le LM et le RM *ex vivo* ne résultent probablement pas de différences au niveau de leurs cellules satellites mais de l'influence de facteurs extrinsèques, comme l'innervation et l'activité contractile associée.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Brooke M.H., Kaiser K.K., 1970. Muscle fiber types: how many and what kind? Arch. Neurol., 23, 369-379.
- Lefaucheur L., 2009. A second look into fibre typing – Relation to meat quality. Meat Sci., in press.
- Nachlas N.M., Tsou K.G., DeCheng CS, Salignam A.M., 1957. Cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase by the use of a new p-nitrophenyl substituted ditetrazole. J. Histochem. Cytochem., 5, 420-436.
- Talmadge R.J., Roy R.R., 1993. Electrophoretic separation of rat skeletal muscle myosin heavy chain isoforms. J. Appl. Physiol., 75, 2337-2340.
- Theil P.K., Sorensen I.L., Oksbjerg N., 2006. Changes in proteolytic enzyme mRNAs relevant for meat quality during myogenesis of primary porcine satellite cells. Meat Sci., 73, 335-343.