2021. Journées Recherche Porcine, 53, 435-436.

Impact d'un challenge sanitaire sur les populations de cellules souches adultes du tissu adipeux chez le porc en croissance

Audrey QUEMENER, Marie-Hélène PERRUCHOT, Frédéric DESSAUGE, Nathalie LE FLOC'H, Isabelle LOUVEAU

PEGASE, INRAE, Institut Agro, 35590 Saint-Gilles, France

audrey.quemener@inrae.fr

Avec la collaboration du personnel de l'élevage et de l'abattoir expérimental de Saint-Gilles (UE 3P)

Impact of a hygiene challenge on adult stem-cell populations in adipose tissue of growing pigs

Adipose tissue is now recognized for its secretory capacity. It helps regulate metabolism and interacts with the immune system. We hypothesized that the impact of a hygiene challenge on the proportions and properties of adult stem cells in adipose tissue may differ between pigs that differ in feed efficiency. At the age of 11 weeks, Large White pigs from two genetic lines divergent in average residual feed intake (RFI) were placed in two contrasting housing hygiene conditions (optimal *vs* degraded). After six weeks of challenge, pigs were slaughtered (n = 6/group). Subcutaneous adipose tissue was removed, and cells from the stromal vascular fraction (FSV), which includes adult stem-cell populations, were isolated. Differentiation of these cells was studied *in vitro* in the absence or presence of Tumor Necrosis Factor-α (TNF-α), a pro-inflammatory cytokine. The ability of these cells to differentiate in the absence or presence of TNF-α did not differ among the four groups of animals ($P > 0.05$). Cell populations from the FSV were phenotyped by flow cytometry using antibodies that targeted different cell-surface markers (CD45 to identify hematopoietic cells; CD34, CD38, CD56 and CD140a to identify cells with adipogenic potential). While the proportions of CD45+ and CD56+ did not differ ($P > 0.05$) between groups, there was an interaction ($P < 0.05$) between genotype and hygiene conditions for the proportions of CD34+ and CD38+ cells. Overall, this study indicates that these cells were affected by poor hygiene in pig housing only in RFI- pigs.

INTRODUCTION

Le tissu adipeux blanc est l'un des tissus les plus importants de l'organisme (Bonnet *et al.*, 2015). Ce tissu fut, d'abord, identifié pour son rôle de stockage des réserves de lipides de l'organisme. Depuis, il est aussi reconnu pour sa capacité à sécréter un grand nombre de facteurs, y compris des cytokines inflammatoires, lui conférant ainsi un rôle dans la régulation du métabolisme. C'est un tissu hétérogène, composé à la fois d'adipocytes et des cellules de la fraction stroma-vasculaire (FSV). Cette fraction comprend notamment des cellules souches adultes (pré-adipocytes), des cellules immunitaires et endothéliales. Pour rappel, les cellules souches adultes sont des cellules indifférenciées capables d'auto-renouvellement, de multipotence et de se différencier en cellules matures. Chez le porc, le rapport masse maigre/masse grasse conditionne l'efficacité de production. Il est fortement influencé par le nombre et la taille des cellules dans les tissus. Au cours de la croissance, l'augmentation du nombre de cellules résulte du recrutement de différentes populations de cellules souches adultes multipotentes résidant dans les tissus. Le but de cette étude était de déterminer si l'exposition à des conditions d'hygiène dégradée du logement, qui induit une inflammation, modifie les proportions et les propriétés des cellules souches adultes résidentes dans le tissu adipeux sous-cutané de deux lignées de porcs, sélectionnées de manière divergente pour la consommation moyenne journalière résiduelle (CMJR).

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Animaux

L'étude s'est déroulée sur l'unité expérimentale 3P (3P, INRAE, 2018. Unité Expérimentale Physiologie et Phénotypage des Porcs, doi : /10.15454/1.5573932732039927 E12) comme cela a été décrit précédemment (Chatelet *et al.*, 2018). Des porcs Large White issus de la 8ème génération de sélection divergente pour la CMJR : la lignée à faible CMJR (CMJR-) *versus* la lignée à forte CMJR (CMJR+) ont été utilisés (n=24). A l'âge de 11 semaines, la moitié des porcs CMJR- et CMJR+ ont été placés dans une loge avec des conditions d'hygiène standard, tandis que les autres animaux ont été installés dans une loge avec des conditions d'hygiène dégradées. Après six semaines de challenge sanitaire, les animaux ont été abattus (n = 6 /groupe). Le tissu adipeux sous-cutané a été prélevé et les cellules de la fraction stroma-vasculaire (FSV), qui comprend les populations de cellules souches adultes, ont été isolées (Perruchot *et al.*, 2013), puis congelées à -150°C.

1.2. Etude de la différenciation adipocytaire *in vitro*

La différentiation adipocytaire des cellules de la FSV a été étudiée *in vitro* en absence ou présence de la cytokine pro-inflammatoire TNF-α. Au jour 0 (J0), les cellules ont été ensemencées à une densité de $2,8*10^5$ cellules/cm^2 (Perruchot *et al.*, 2013). De J0 à J4, elles ont été mises en culture dans du milieu de prolifération. A J4, elles ont été placées dans un milieu de transition puis, de J6 à J22, dans du milieu de différenciation adipogénique en absence ou présence (0, 1 et 10 ng/mL) de TNF-α porcin (R&D Systems). L'estimation de l'accumulation lipidique dans les cellules à l'aide du logiciel ImageJ (ImageJ 1.50i, National Institutes of Health, Bethesda, Etats-Unis) a permis d'évaluer le pourcentage de différenciation adipocytaire à partir des photos prises aux jours de culture J14, J18 et J22 avec un microscope à contraste de phase (AxioVert A1, Zeiss).

1.3. Phénotypage des cellules FSV du tissu adipeux

Le phénotypage des populations cellulaires a été réalisé avec le cytomètre en flux MACSQuant Analyzer 10 (Miltenyi). Les cellules ont été marquées avec les anticorps (Ac) suivants : anti-CD34 (Abcam), anti-CD38 (Miltenyi), anti-CD56 (BD) et anti-CD140a (Miltenyi) pour discriminer les cellules ayant un potentiel adipogénique et l'Ac anti-CD45 (Bio-Rad) pour éliminer les cellules hématopoïétiques. Les données acquises par le cytomètre ont été obtenues à partir d'un minimum de 50000 événements par échantillon et ont ensuite été analysées par le logiciel Flowlogic (Inivai). L'expression des cellules est rapportée au pourcentage de cellules CD45-.

1.4. Analyses statistiques

Les analyses de variance ont été effectuées avec le logiciel R (R Core Team, 2015). Pour les données de différenciation cellulaire, l'analyse a été réalisée par jour de culture pour tester l'effet du génotype, du stress sanitaire, de la dose de TNF-α et des interactions correspondantes. Pour les données de phénotypage, l'analyse a été effectuée pour tester l'effet du génotype, du stress sanitaire et de l'interaction. Un seuil de probabilité de $P < 0,05$ a été retenu.

2. RESULTATS

2.1. Etude de la différenciation adipocytaire *in vitro*

Une augmentation de la différenciation adipocytaire a été observée au cours du temps, avec une différenciation maximale des cellules entre le 18ème et le 22ème jour de culture pour tous les groupes d'animaux. En revanche, que ce soit à J14, J18 ou J22, ce pourcentage de différenciation n'est affecté ni par la lignée génétique, ni par le challenge sanitaire ($P > 0,05$). A J14 et J18, la différenciation adipocytaire des cellules est inhibée ($P < 0,05$) par la présence de TNF-α aux deux doses testées (données non présentées). En revanche, à J22, seule la dose 10 ng/mL de TNF-α réduit la différenciation adipocytaire ($P < 0,05$) (Figure 1).

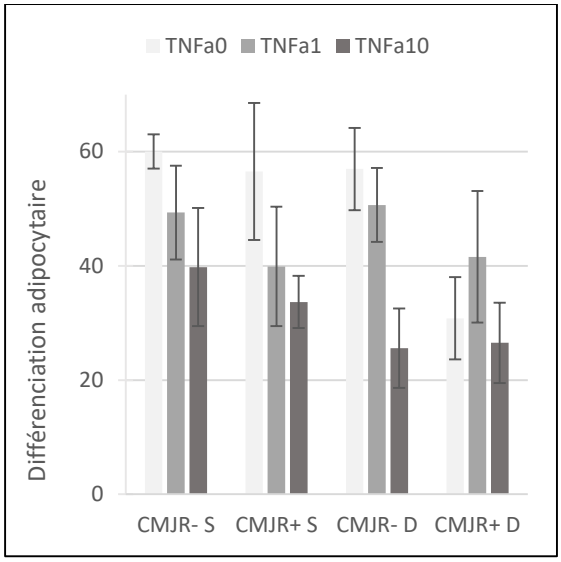

Figure 1 – Pourcentage moyen (± SEM) de différenciation adipocytaire (%) des cellules FSV issues des porcs CMJR- et CMJR+ élevés en conditions d'hygiène standards (S) ou dégradées (D) au 22ème jour de culture, en absence ou présence de TNF-α (n=5/groupe).

2.2. Phénotypage des cellules FSV du tissu adipeux

Pour les quatre groupes de porcs, les cellules CD56+ (30%) et les cellules CD45+ (16%) sont prédominantes et leurs proportions ne varient pas entre les groupes ($P > 0,1$). La proportion des cellules CD140a+ tend à être réduite ($P > 0,05$) par les conditions d'hygiène dégradées. Pour les cellules CD34+ et CD38+, l'interaction est significative ($P < 0,05$) avec un impact sur les cellules des animaux CMJR- uniquement.

CONCLUSION

Cette étude montre que les capacités de différentiation, en absence ou en présence de TNF-α, des cellules souches adultes résidentes dans le tissu adipeux ne sont pas influencées par le type génétique et les conditions d'hygiène. La mise en évidence d'un impact de ces conditions d'hygiène sur les proportions des cellules CD34+ et CD38+ chez les animaux CMJR- conforte la différence de réponse de ces animaux à un stress sanitaire. Des analyses complémentaires sont nécessaires pour identifier les différentes sous-populations cellulaires présentes dans le tissu adipeux et examiner les capacités sécrétoires de ces cellules chez ces animaux.

REMERCIEMENTS

Une partie de ces travaux a été réalisée grâce au soutien financier du 7ième programme cadre européen (FP7, projet PROHEALTH, subvention no. 613574). Les auteurs remercient aussi Rémi Resmond pour ses conseils lors de l'analyse statistique des données.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bonnet M., Louveau I., Cassar-Malek I., Lefaucheur L., Rescan P.Y., 2015. Comprendre le développement des muscles et des tissus adipeux : un préalable pour maîtriser les qualités des carcasses et des produits des animaux d'élevage. INRAE Prod. Anim., 28, 137-150.
- Chatelet A., Gondret F., Merlot E., Gilbert H., Friggens N.C., Le Floc'h N., 2018. Impact of hygiene of housing conditions on performance and health of two pig genetic lines divergent for residual feed intake. Animal, 12, 350-358.
- Perruchot M.-H., Lefaucheur L., Barreau C., Casteilla L., Louveau I., 2013. Age-related changes in the features of porcine adult stem cells isolated from adipose tissue and skeletal muscle. Am. J. Physiol. Cell Physiol., 305, C728-C738.