

REEXPRESSION DE FACTEURS MYOGENIQUES PRECOCES AU MOMENT DE L'APPARITION DES DEFAUTS MUSCULAIRES CHEZ LE POULET STANDARD

Christophe Praud¹, Michel Duclos¹, Estelle Godet¹, Thierry Bordeau¹, Jean-Marc Thoby², V  rane Gigaud², Cécile Berri¹

¹INRAE, Université de Tours, BOA, 37380 Nouzilly,

²DSM - Nutritional Products France, Tour Nova, 71 boulevard National, 92 250 La Garenne-Colombes

christophe.praud@inrae.fr

RÉSUMÉ

Les souches de poulet à croissance rapide présentent des défauts musculaires qui pénalisent fortement la qualité de la viande. Les deux principaux sont les défauts *White Striping* (WS) et *Wooden Breast* (WB) qui impliquent des processus de dégénérescence et régénération des fibres musculaires accompagnés d'un développement excessif de matrice extracellulaire. Notre objectif était de suivre l'évolution dès l'incubation jusqu'à l'abattage (E17, J0, J6, J21, J36) de l'expression g  n  que des principaux facteurs myogéniques et marqueurs de différenciation impliqués dans la formation et la régénération du muscle : Pax7 et Myf5, respectivement marqueurs des cellules satellites et de prolifération des myoblastes ; MyoD impliqué dans la prolifération et l'engagement dans la différenciation des myoblastes en myocytes ; la Myogénine qui intervient lors de la fusion des myocytes en myotubes ; plusieurs isoformes de chaines lourdes de myosine (MyHC) dont l'expression évolue au cours de la croissance en lien avec l'établissement des propriétés contractiles et métaboliques du muscle ; plusieurs protéines (TGF  , PDGFRA, COL6A3, FN1) impliquées dans la mise en place de la matrice extracellulaire. Nos résultats précisent les mécanismes cellulaires impliqués dans l'établissement des défauts musculaires chez le poulet et identifient de nouveaux marqueurs potentiels pour leur diagnostic et leur prévention.

ABSTRACT

Re-expression of early myogenic factors at the onset of muscle defects in standard chickens

Fast-growing chicken strains show muscle defects that strongly penalize meat quality. The most commonly reported are the *White Striping* (WS) and *Wooden Breast* (WB) defects, which involve processes of degeneration and regeneration of muscle fibers accompanied by an excessive development of extracellular matrix. Our objective was to follow the evolution from incubation to slaughter (E17, D0, D6, D21, D36) of the gene expression of the main myogenic factors and differentiation markers involved in muscle formation and regeneration: Pax7 and Myf5, satellite cell and myoblast proliferation markers, respectively; MyoD involved in proliferation and commitment to differentiation of myoblasts into myocytes; myogenin involved in fusion of myocytes into myotubes; several myosin heavy chain (MyHC) isoforms whose expression evolves during growth in connection with the establishment of contractile and metabolic properties of muscle; several proteins (TGF  , PDGFRA, COL6A3, FN1) involved in the development of extracellular connective matrix. Our results clarify the cellular mechanisms involved in the establishment of muscle defects in chicken and identify new potential markers for their diagnosis and prevention.

INTRODUCTION

Depuis une dizaine d'année sont apparus dans les souches de poulet à croissance rapide des défauts musculaires qui pénalisent en premier lieu l'aspect visuel de la viande mais aussi ses caractéristiques nutritionnelles et technologiques (Baéza et al., 2019). Dans les cas les plus graves, ces défauts peuvent même entraîner des saisies et le retrait des produits à l'abattoir. En plus des pertes économiques engendrées pour la filière, la présence de ces défauts a récemment été associée à des problèmes de bien-être animal en élevage (Norrington et al., 2018) et leur nature même (myopathie) altère gravement l'image de la production standard auprès des consommateurs.

Les deux principaux défauts reportés sur le terrain sont le *White Striping* (WS) et le *Wooden Breast* (WB) qui impliquent des processus de dégénérescence et régénération des fibres musculaires, généralement accompagnés d'un développement excessif de la matrice extracellulaire (conjonctif et adipocytes). Si nous disposons maintenant d'un nombre important de données concernant les modifications histologiques, et les dérégulations géniques et métaboliques associés aux défauts (Abasht et al., 2016 ; Pampouille et al., 2019 ; Praud et al., 2021), nous manquons de données concernant l'évolution durant le développement de l'expression génique des principaux facteurs myogéniques impliqués dans la formation et la régénération du muscle, via notamment leur effet sur l'activation des cellules souches adultes, encore appelées cellules satellites (Mauro, 1961).

Dans cette étude, nous avons suivi dans une souche de poulet à croissance rapide (Ross 308), concernée par les défauts WS et WB, l'évolution de l'expression des principaux facteurs impliqués dans la formation et la régénération musculaire depuis la fin de l'incubation (E17), l'éclosion (J0) puis à différents stades jusqu'à l'abattage (J6, J21, J36). Les facteurs myogéniques ciblés étaient : Pax7 et Myf5, respectivement marqueurs des cellules satellites et de prolifération des myoblastes ; MyoD impliqué dans la prolifération et l'engagement dans la différenciation des myoblastes en myocytes ; la Myogénine qui intervient lors de la fusion des myocytes en myotubes (Zammit et al., 2006). Nous avons également suivi les étapes de différenciation musculaire au travers de l'étude de plusieurs isoformes de chaînes lourdes de myosine (MyHC) et de marqueurs de la trame conjonctive (TGFβ, PDGFRA, COL6A3, FN1) dont l'expression évolue au cours de la croissance en lien avec l'établissement des propriétés du muscle.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Dispositif expérimental et prélèvements

Les prélèvements de muscle *Pectoralis major* (filet) ont été réalisés sur une population de poulets mâles

Ross 308 incubés et élevés en conditions classiques à l'unité expérimentale PEAT (Centre INRAE Val de Loire, 37380 Nouzilly). A chaque stade, c'est-à-dire 17 jours d'incubation (E17), éclosion (J0), 6, 21 et 36 jours post-éclosion (J6, J21, J36), 12 muscles ont été prélevés dans les 5-10 minutes qui ont suivi la mort des animaux. Les muscles ont été congelés directement dans l'azote liquide et conservés à -80°C jusqu'à utilisation.

1.2. Quantification des niveaux d'expression des ARN messagers (ARNm)

Les muscles ont été broyés sous azote liquide et les ARNm ont été extraits à partir de 100 mg de broyat selon la méthode décrite par Chomzynski et Sacchi (1987). Une fois la qualité des ARNm vérifiée au Nanodrop (ratio 260/280 et 260/230 compris entre 1,8 et 2,2) et sur gel d'agarose (1%), 10 µg ont été rétro-transcrits pour obtenir les ADN complémentaires (ADNc) qui ont servi à la quantification de l'expression des gènes par PCR en temps réel. Cette phase a été réalisée sur la plateforme de microfluidique - Biomark de GeT-PlaGe (Centre INRAE de Toulouse) en utilisant des couples d'amorces spécifiques et validés en amont pour chaque gène. Le calcul des niveaux absolus d'ARNm a été réalisé en se basant sur l'efficacité de la PCR et la déviation du cycle seuil de l'ADNc de l'échantillon à quantifier par rapport à un ADNc témoin selon l'équation proposée par Pfaffl (2001).

1.3. Analyse statistique

L'effet du stade (âge) a été évalué pour chaque gène en appliquant un test Kruskal-Wallis. Les différences entre deux stades ont été jugées significatives pour une probabilité $P \leq 0,05$.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1 Evolution de l'expression des facteurs myogéniques précoces au cours du développement

Chez le poulet, la population de cellules satellites apparaît dans les masses musculaires tardivement au cours de la vie fœtale, entre E15 et E17. A E18, la population de cellules satellites représente environ 85% de tous les progéniteurs musculaires et à l'éclosion la totalité (Gros et al., 2005). Les cellules satellites aviaires expriment le facteur de transcription Pax7. Nous avons observé que l'expression de Pax7 est maximale à E17 puis décroît régulièrement jusqu'à J21 (**Figure 1A**). Celle de Myf5, exprimé à la fois dans les cellules satellites et les myoblastes en prolifération, se maintient logiquement à un niveau élevé jusqu'à l'éclosion puis chute ensuite jusqu'à des niveaux 5 à 6 fois inférieurs durant la croissance post-natale (**Figure 1B**). La forte expression de Myf5 et Pax7 à E17 s'explique par le fait qu'à ce stade de développement, les cellules satellites s'installent dans leur niche de cellule souche au sein des fibres musculaires.

A l'éclosion, nous observons un pic d'expression du facteur myogénique MyoD, qui est un marqueur d'engagement dans la différenciation des myoblastes. Son expression diminue progressivement par la suite jusqu'à J21 (**Figure 2A**). Le profil d'expression de la Myogénine, impliquée dans la fusion des myotubes et la maturation des fibres musculaires, est plus complexe, avec deux pics d'expression observés à E17 et J6, indiquant que d'importants phénomènes de différenciation se déroulent à ces deux stades (**Figure 2B**).

La diminution du rapport MyoD/Myf5 est un indicateur de l'activité proliférative des cellules satellites. Il est minimal à E17 et à l'éclosion, puis décroît de nouveau à J21 (**Figure 3A**). Une forte activité proliférative au sein du muscle jusqu'à l'éclosion est confirmée par le niveau élevé d'expression du facteur de prolifération PCNA (**Figure 3B**). La forte activité proliférative observée à l'éclosion est cohérente avec l'expression particulièrement faible de la Myogénine, qui est un marqueur de différenciation des cellules musculaires. A J6, les niveaux d'expression des différents facteurs myogéniques étudiés indiquent à l'inverse un engagement fort des cellules musculaires dans la voie de la différenciation, avec notamment une baisse de l'expression de Myf5, MyoD et Pax7, et une augmentation de l'expression de la Myogénine et du rapport MyoD/Myf5.

En accord avec les connaissances acquises à ce jour, l'expression des facteurs myogéniques diminuent graduellement après l'éclosion. Toutefois, nos résultats indiquent qu'entre 21 et 36 jours l'expression de certains d'entre eux augmentent de nouveau. C'est notamment le cas pour le marqueur de prolifération PCNA, le marqueur des cellules satellites Pax7, et le marqueur de différenciation MyoD. Cette augmentation à des stades tardifs de facteurs myogéniques précoces pourraient être liée aux phénomènes de nécrose-régénération des fibres fréquemment observés à l'âge d'abattage dans les muscles pectoraux des souches de poulets à croissance rapide et qui sont liés à l'apparition des défauts de qualité WS et WB (Praud et al., 2020). Une augmentation nette du rapport MyoD/Myf5 est également observée à J36, qui pourrait indiquer un déficit de capacité proliférative des cellules satellites à ce stade, expliquant ainsi la difficulté du muscle à former de nouvelles fibres. Ce déficit de capacité proliférative est souvent associé à un dépôt de tissu fibreux et adipeux extracellulaire, dépôts observés chez le poulet standard (Praud et al., 2020).

2.2 Evolution de l'expression des marqueurs de différenciation musculaire

Les myosines constituent l'appareil contractile du muscle strié. Elles sont composées de deux chaînes

lourdes, les MyHC et 4 chaînes légères, les MyLC. Il en existe plusieurs formes, dont les propriétés sont directement liées à l'activité contractile, et donc métabolique, du muscle. Au cours du développement du muscle *Pectoralis major*, deux isoformes de MyHC, embryonnaire et néonatale, sont exprimées de manière transitoire avant de laisser place à la forme dite adulte.

De E17 à J21, l'évolution de l'expression des différentes formes de MyHC au cours du développement est conforme à celle attendue, à savoir : une décroissance progressive de l'expression de la forme embryonnaire, un pic d'expression à J6 pour la forme néonatale et une augmentation progressive de l'expression de la forme adulte (**Figures 4A-C**). Entre J21 et J36, l'augmentation de l'expression de la forme adulte se poursuit, et de manière plus surprenante nous observons une augmentation conséquente ($\times 3$ par rapport à J21) de l'expression de la forme embryonnaire. Nous observons également une forte augmentation ($\times 6$ par rapport à J21) de l'expression d'une forme de MyHC spécifique des fibres en régénération : MyH15 (**Figure 4D**). La réexpression tardive (J36) de ces marqueurs de régénération est concomitante à celle de plusieurs marqueurs du développement du tissu conjonctif (TGF β , PDGFRA, COL6A3, FN1, **Figures 5A-D**), dont il a été montré que l'expression augmente avec l'apparition de fibrose dans les muscles atteints de WS et WB (Praud et al., 2020).

CONCLUSION

Le suivi de l'expression des principaux facteurs myogéniques au cours du temps montre une cinétique d'évolution cohérente avec les différents événements de prolifération et de différenciation cellulaires qui interviennent lors de la formation du muscle strié squelettique. De manière intéressante, nos résultats montrent une réexpression tardive de facteurs myogéniques précoces. Celle-ci est concomitante à l'augmentation d'expression de protéines exprimées par les fibres musculaires en régénération et la matrice conjonctive du muscle. Il est maintenant bien établi que ces deux phénomènes (régénération des fibres et fibrose extracellulaire) sont largement impliqués lors de l'établissement des défauts musculaires *Wooden Breast* et *White Striping* qui affectent actuellement les souches de poulet à croissance rapide utilisées pour la production standard. Ceci suggère que la mise en place de ces défauts induit une dérégulation des facteurs myogéniques précoces, qui constituent de ce fait de nouveaux marqueurs potentiels pour leur diagnostic et leur prévention. Des études complémentaires sont nécessaires pour comprendre les facteurs génétiques ou environnementaux à l'origine de leur réactivation dans le muscle des poulets en croissance, et les mécanismes de régulation associés.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abasht B., Mutryn M.F., Michalek R.D., Lee W.R., 2016. Plos One. (11), e0153750.
- Baéza E., Le Bihan-Duval E., Pampouille E., Bourin M., Berri C. In '13èmes JRAPFG', 20-21/03, Tours, France. pp. 442-453.
- Chomczynski P., Sacchi N., 1987. Anal. Biochem., (162):156-159.
- Gros J, Manceau M, Thomé V, Marcelle C., 2005. Nature. (435:7044), 954-958.
- Mauro A., 1961. J. Biophys. Biochem. Cytol. (9), 493-495.
- Norring M., Valros A., Valaja J., Sihvo H.K., Immonen K., Puolanne E., 2018. Animal. (17), 1-6.
- Pampouille E., Hennequet-Antier C., Praud C., Juanchich A., Brionne A., Godet E., Bordeau T., Fagnoul F., Le Bihan-Duval E., Berri C., 2019. Sci Rep. (9), 14905.
- Pfaffl M.W., 2001. Nucleic Acids Res. (29), e45.
- Praud C., Jimenez J., Pampouille E., Couroussé N., Godet E., Le Bihan-Duval E., Berri C., 2020. Front Physiol. (11), 633.
- Praud C., Pampouille E., Le Bihan-Duval E., Berri C., 2021. Front Physiol. (12), 745031.
- Zammit P.S., Partridge T.A., Yablonka-Reuveni Z. 2006 J. Histochem. Cytochem. (54), 1177-1191.

Figure 1. Niveaux d'expression en ARNm des facteurs myogéniques Pax7 (A) et Myf5 (B).
a-d : différences significatives entre stades ($P \leq 0,05$)

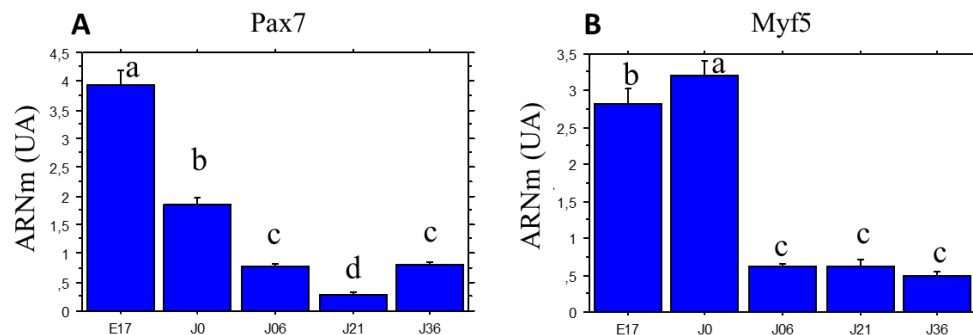


Figure 2. Niveaux d'expression en ARNm des facteurs myogéniques MyoD (A) et Myogénine (B).
a-d : différences significatives entre stades ($P \leq 0,05$)

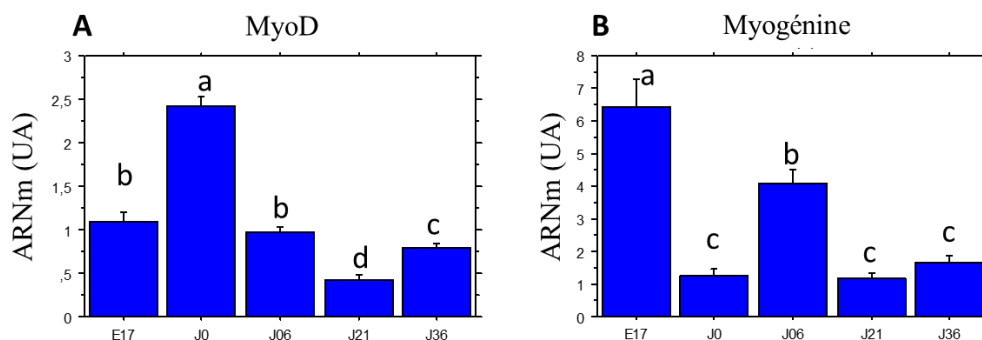


Figure 3. Rapport entre l'expression ARNm des facteurs MyoD et Myf5 (A) et niveau d'expression en ARNm du marqueur de prolifération PCNA (B). a-d : différences significatives entre stades ($P \leq 0,05$)

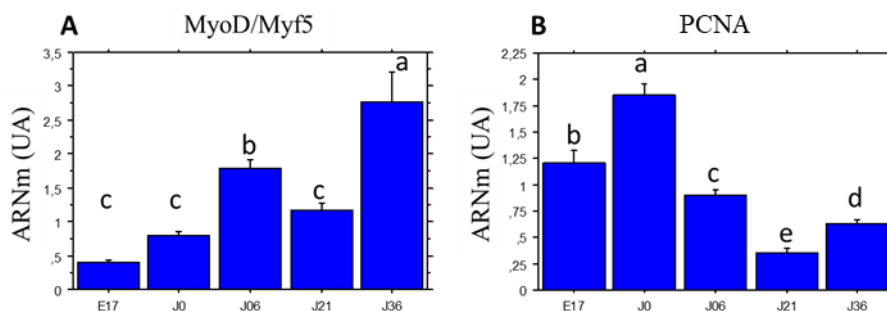


Figure 4. Niveaux d'expression en ARNm des isoformes de chaînes lourdes de myosine, MyHC embryonnaire (A), néonatale (B), adulte (C), 15 (D). a-d : différences significatives entre stades ($P \leq 0,05$)

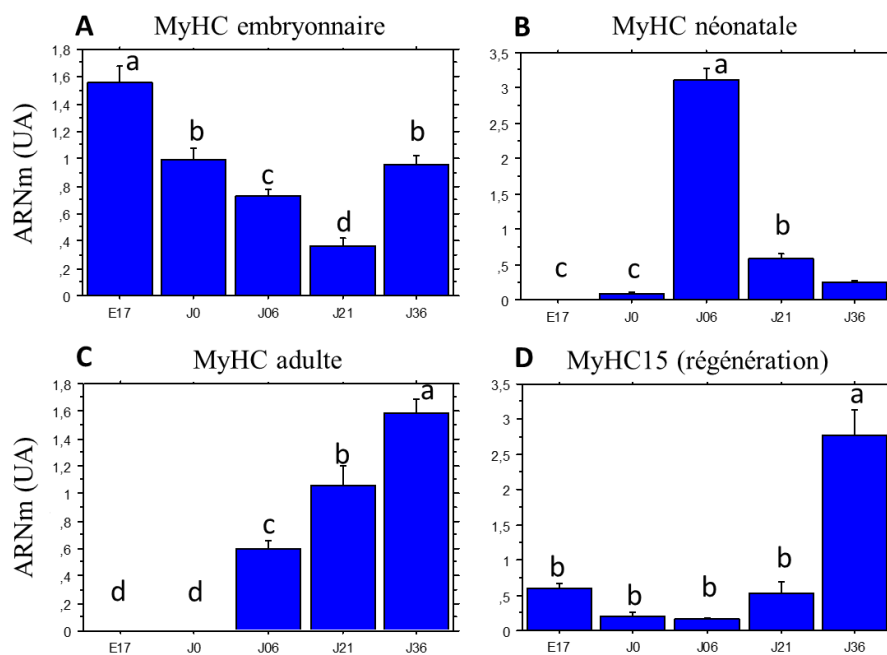


Figure 5. Niveaux d'expression en ARNm de gènes impliqués dans la formation de la matrice extracellulaire, PDGFRA (A), TGF β (B), COL6A3 (C), FN1 (D). a-d : différences significatives entre stades ($P \leq 0,05$).

