HAL
open science

Caractérisation moléculaire et cellulaire des précurseurs myogéniques du muscle hyperplasique de la truite

Sabrina Jagot

To cite this version:

Sabrina Jagot. Caractérisation moléculaire et cellulaire des précurseurs myogéniques du muscle hyperplasique de la truite. Sciences agricoles. Agrocampus Ouest, 2018. Français. NNT : 2018NSARI080 . tel-02373463

HAL Id: tel-02373463

https://theses.hal.science/tel-02373463v1

Submitted on 21 Nov 2019

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.

THESE DE DOCTORAT DE

AGROCAMPUS OUEST
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 600
Ecole doctorale Ecologie, Géosciences, Agronomie et Alimentation
Spécialité : « *Biochimie, Biologie Moléculaire et Cellulaire*»

Par
Sabrina Jagot

Caractérisation moléculaire et cellulaire des précurseurs myogéniques du muscle hyperplasique de la truite

Thèse présentée et soutenue à Rennes, le 21 novembre 2018
Unité de recherche : LPGP INRA Beaulieu
N° Ordre : 2018-24
N° Série : I-80

Rapporteurs avant soutenance :

Véronique Blanquet	Professeur / Université de Limoges
Angèle Chopard	Professeur / Université de Montpellier

Composition du Jury :

Président :	Sandrine Lagarrigue	Professeur / Agrocampus Ouest
Examinateurs :	Isabelle Cassar-Malek	Directeur de Recherche / INRA
Dir. de thèse :	Jean-Charles Gabillard	Directeur de Recherche / INRA
Co-dir. de thèse :	Pierre-Yves Rescan	Directeur de Recherche / INRA

N° Ordre : 2018-24
N° Série : I-80

THESE / AGROCAMPUS OUEST

Sous le label de l'Université de Bretagne Loire

Pour obtenir le diplôme de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT SUPERIEUR DES SCIENCES AGRONOMIQUES,AGRO-ALIMENTAIRES, HORTICOLES ET DU PAYSAGE

Spécialité : Biochimie, Biologie Moléculaire et Cellulaire

Ecole Doctorale : Ecologie, Géosciences, Agronomie et Alimentation

Présentée par :

SABRINA JAGOT

CARACTERISATION MOLECULAIRE ET CELLULAIRE DES PRECURSEURS MYOGENIQUES DU MUSCLE HYPERPLASIQUE DE LA TRUITE

Soutenue le 21 Novembre 2018 devant la commission d'Examen

Composition du Jury :

Pr Sandrine LAGARRIGUE, Professeur Agrocampus Ouest / Examinateur

Pr Véronique BLANQUET, Professeur Université de Limoges / Rapporteur

Pr Angèle CHOPARD, Professeur Université de Montpellier / Rapporteur

Dr Isabelle CASSAR-MALEK, Directeur de Recherche INRA / Examinateur

Dr Jean-Charles GABILLARD, Directeur de Recherche INRA / Directeur de Thèse

Dr Pierre-Yves RESCAN, Directeur de Recherche INRA / Directeur de Thèse

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier Sandrine Lagarrigue, Véronique Blanquet, Angèle Chopard et Isabelle Cassar-Malek, membres de mon jury, d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Je tiens à remercier l'INRA et la Région Bretagne pour le financement de ce projet de thèse.

Pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire et pour tous ses conseils, je remercie le directeur Julien Bobe.

Merci à Raymond Kaas pour m'avoir introduit au monde merveilleux de la science, au laboratoire Ifremer de Nantes, lors de mon tout premier stage.

Pour m'avoir transmis la passion de la fabuleuse histoire des cellules souches musculaires, pour avoir cru en moi, un grand merci à Karl Rouger et Laetitia Guevel.

Merci à mes directeurs de thèse, pour leur encadrement et toutes ces fructueuses discussions au cours de ces 3 ans. Merci à Jean-Charles, pour les nombreux conseils et le partage scientifique apportés tout au long de ce projet. Merci à Pierre-Yves, pour son aide précieuse et sa disponibilité.

Et quand ça croque chez CroQ ! Merci à tous les membres de l'équipe, pour votre sympathie ; à Jérôme, pour ton aide sur visilog, à Florence, pour ta gentillesse et les études sensorielles, Toujours un plaisir !, à Olivier (aujourd'hui parti pour de nouveaux horizons), à Nathalie, Véronique et Cécile, pour votre aide et votre soutien, et à Diane, nouvelle camarade de doctorat, pour ta bonne humeur et ta bienveillance.

A Nathalie, sans qui les extractions cellulaires auraient manqué de magie. Pizzas, sculptures et sparadraps !! Toujours à l'écoute, toujours un soutien, merci pour tout !

Merci au personnel des IE, pour les super soins que vous portez aux poissons, desquels dépendent tous nos travaux.

Merci à Béa et Adèle, pour votre aide sur l'automate et en histo en général.

A Jérôme et Aurélie, un grand merci pour votre disponibilité et vos conseils sur les analyses transcriptomiques, du miRnome et de la méta-analyse.

Merci à Guylène, Agnès, Sylvie, Maryse, Céline, Nathalie et Patricia pour leur aide au quotidien.

A l'ensemble du personnel du LPGP, merci pour la sympathie et la chaleureuse convivialité qui règne autour, notamment, des gâteaux du jeudi !

Un grand merci aux titulaires, non titulaires et stagiaires, pour les soirées pizza, pour ces midis en folies, ces jeudis soirs journal club et hibou, à parler encore et toujours de science et, parfois même, de science-fiction ! Merci à Ahmed, camarade de promo, pour ces moments partagés.

A vous mes chauffeurs ; collègues, amis et famille, quand mes soucis de santé sont survenus, je n'oublierai pas votre soutien. A vous qui avez été là : un simple Merci ! ne saurait suffire.

A Stéphanie et Laury KiRit, devenues bien plus que des collègues, merci pour ces week end jeux et, en fin de compte, merci pour tout ce que vous êtes ! Quand une faille spatio-temporelle apparaît surtout : plongeons ! #ToujoursPlus #EnTouteObjectivité #TumVoisTumVoisPlus

Merci à mes amis, pour leurs soutien, pour toutes ces soirées, ces randonnées, ces éclats de rires que l'on partage depuis parfois de nombreuses années !

A ma Ju, pour tous les instants de bonheur et de joie, pour toutes ces heures passées à jouer, à débattre, à partager, à échanger. Présente depuis toujours, merci !

Merci aux normands, pour tous ces bons moments.

A mes parents qui m'ont toujours soutenu et accompagné dans l'ensemble de mes projets de vie, toute petite déjà, et à tous les moments de mon parcours, même lorsque ces projets pouvaient paraître fous ! A cœur vaillant, rien d'impossible.

A l'ensemble de ma famille, récemment agrandie, merci pour votre bienveillance, pour vos attentions, pour le soutien indéfectible que vous me portez… merci pour tout.

A toi, mon âme sœur, merci pour ce que tu es, pour l'équipe que nous formons et pour celle que j'aime devenir à tes côtés (#WW).

Table des matières

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE 1

1.1. INTRODUCTION GENERALE 3

1.2. LE TISSU MUSCULAIRE SQUELETTIQUE 5

1.2.1. Généralités 5
1.2.2. Le développement du muscle axial et des membres chez les amniotes et origine embryonnaire des cellules satellites 8
1.2.3. Le développement du muscle axial chez les poissons et origine embryonnaire des cellules satellites 10
1.2.4. Autres origines possibles des cellules satellites dans le muscle squelettique adulte 12
1.2.5. La croissance post-larvaire chez les poissons : hypertrophie et hyperplasie 13

1.3. LES CELLULES SATELLITES 17

1.3.1. Généralités 17
1.3.2. Hétérogénéité phénotypique des cellules satellites 18
1.3.3. Un mécanisme cellulaire des cellules satellites : la division asymétrique 20
1.3.4. Implication des cellules satellites dans la croissance hypertrophique 22
1.3.5. Implication des cellules satellites dans la croissance hyperplasique 24
1.3.6. Rôles des cellules satellites dans le processus de régénération 26
1.3.7. Mécanismes moléculaires impliqués dans l'activation ou la quiescence des cellules satellites 27
1.3.7.1.Gènes régulateurs de la prolifération et de la différenciation des cellules satellites 27
1.3.7.2.MiARN impliqués dans la myogenèse 31
1.3.7.3.Rôle des régulations épigénétiques 33
1.3.7.4.Influence du microenvironnement sur les précurseurs myogéniques 35

OBJECTIFS ET STRATEGIES 37

CHAPITRE 1 : LES ANALYSES HISTOLOGIQUES, TRANSCRIPTOMIQUES ET *IN VITRO* REVELENT QUE LES PRECURSEURS MYOGENIQUES DU MUSCLE HYPERPLASIQUE DE LA TRUITE SONT ACTIVES 39

RESUME DE L'ARTICLE 41
ARTICLE : HISTOLOGICAL, TRANSCRIPTOMIC AND *IN VITRO* ANALYSIS REVEAL AN INTRINSIC ACTIVATED STATE OF MYOGENIC PRECURSORS IN HYPERPLASIC MUSCLE OF TROUT 44

CHAPITRE 2 : DES SIGNATURES TRANSCRIPTOMIQUES DISTINCTES SONT ASSOCIEES AUX DIFFERENCES DE COMPORTEMENT *IN VITRO* DES PRECURSEURS MYOGENIQUES ISSUS DE TRUITES JUVENILES A JEUN ET ADULTES. 71

2.1. LES PRECURSEURS MYOGENIQUES QUIESCENTS EXTRAITS DE MUSCLE ADULTE ET DE TRUITES JUVENILES A JEUN ONT UNE SIGNATURE TRANSCRIPTOMIQUE SPECIFIQUE. 74

2.2. LES PRECURSEURS MYOGENIQUES PROVENANT DES TRUITES JUVENILES A JEUN SUR-EXPRIMENT DES GENES ASSOCIES A LA DIFFERENCIATION MYOGENIQUE. 76

2.3. LES PRECURSEURS MYOGENIQUES EXTRAITS DU MUSCLE DE LA TRUITE ADULTE SUR-EXPRIMENT LES GENES LIES AU CYCLE CELLULAIRE 79

CHAPITRE 3 : IDENTIFICATION DES MIARN ET DES COUPLES POTENTIELS MIARN-ARNM CIBLE ASSOCIES A L'ETAT ACTIVES ET QUIESCENTS DES PRECURSEURS MYOGENIQUES DE LA TRUITE. 83

3.1. MATERIELS ET METHODES 87

3.1.1. Animaux 87
3.1.2. Isolement des précurseurs myogéniques de la truite 87
3.1.3. Hybridation du microréseau de miARNs et traitement des données 87
3.1.4. Analyse statistique 88
3.1.5. Méta-analyses 88

3.2. RESULTATS-DISCUSSION 89

3.2.1. L'analyse du miRnome montre trois signatures d'expressions spécifiques dans les précurseurs myogéniques extraits de truites juvéniles (JT), juvéniles à jeun (FJT) et adultes (AT). 89
3.2.2. Les précurseurs myogéniques issus de muscle hyperplasique sur-expriment des miARN spécifiques de l'état activé 91
3.2.3. Une signature expressionnelle des miARNs spécifique liée à l'âge de l'animal. 92
3.2.4. Les miARN connus pour être impliqués dans l'inhibition de la différenciation myogénique sont surexprimés dans les précurseurs myogéniques extraits de muscle non-hyperplasique de truite 93
3.2.5. Identification de couples miARN-ARNm cible potentiellement impliqués dans l'activation et la quiescence des précurseurs myogéniques chez la truite. 94

DISCUSSION GENERALE 103

REFERENCES 109

ANNEXES 123

Liste des figures

Figure 1 : Cellule satellite observée en microscopie électronique.

Figure 2 : Anatomie du muscle axial de la truite (adapté de Bugeon.J).

Figure 3 : Anatomie du muscle squelettique.

Figure 4 : Myogenèse chez la souris.

Figure 5 : Répartition de la taille des fibres du muscle rapide en fonction de la taille de la truite.

Figure 6 : Expression de GFP chez les truites transgéniques juvéniles et adultes.

Figure 7 : Profil transcriptionnel des progéniteurs musculaires dans la myogenèse.

Figure 8 : Devenir des cellules satellites *in vivo*.

Figure 9 : Croissance musculaire post-embryonnaire chez les poissons téléostéens

Figure 10 : Régulation du cycle cellulaire dans les cellules satellites.

Figures de l'article (Partie I) :

Figure 1: Quantification of satellite cells proliferation in hyperplasic and non-hyperplasic muscle of trout

Figure 2: Hierarchical clustering of differentially expressed genes between JT myogenic precursors and FJT and AT myogenic precursors.

Figure 3: Hierarchical clustering of differentially expressed cell cycle genes between JT myogenic precursors and FJT and AT myogenic precursors.

Figure 4: Hierarchical clustering of differentially expressed myogenic genes between JT myogenic precursors and FJT and AT myogenic precursors.

Figure 5: Proliferation rate of JT, FJT and AT myogenic precursors after 2, 5, 8, 11 days of plating (D2, D5, D8 and D11).

Figure 6: Differentiation rate of JT, FJT and AT myogenic precursors after 2, 5, 8, 11 days in culture (D2, D5, D8 and D11).

Figure 7: Quantification of the expression of myogenin and myomaker in JT, FJT and AT myogenic precursors.

Figure 11 : Cluster hiérarchique des gènes différentiellement exprimés entre les précurseurs myogéniques FJT et les précurseurs myogéniques AT.

Figure 12 : Capacités de différenciation des précurseurs myogéniques FJT et AT en culture.

Figure 13 : Cluster hiérarchique des gènes du cycle cellulaire différentiellement exprimés entre les précurseurs myogéniques FJT et AT.

Figure 14 : Regroupement hiérarchique des miARN exprimés de façon différentielle dans les précurseurs myogéniques JT, FJT et AT.

Figure 15 : Stratégie utilisé pour la prédiction *in silico* les cibles des miARN par l'utilisation des données du transcriptome et du miRnome.

Liste des tableaux

Tableaux de l’article (Partie I) :

Table 1: Functional categories inferred from up regulated genes in JT myogenic precursors.

Tableau 1 : Catégories fonctionnelles déduites des gènes sous-exprimés dans les précurseurs myogéniques AT et surexprimés dans les précurseurs myogéniques FJT.

Tableau 2 : Catégories fonctionnelles déduites des gènes sur exprimés dans les précurseurs myogéniques AT et sous exprimés dans les précurseurs myogéniques FJT.

Tableau 3 : miARN différentiellement exprimés et présents dans l'un des trois clusters identifiés par l'analyse de clustering.

Tableau 4 : Couples miARN-ARNm cible prédits via miRanda et potentiellement associés à l’activation des précurseurs myogéniques.

Tableau 5 : Couples miARN-ARNm cible prédits via miRanda et potentiellement associés à la quiescence des précurseurs myogéniques.

Liste des abréviations

ARN	Acide Ribonucléique
ARNm	ARN-messager
AT	Adult Trout
ATP	Adenosine Triphosphaste
BrdU	Bromodésoxyuridine
DAPI	4', 6'-diamidino-2-phenylindole
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EDL	Extensor Digitorum Longus
FJT	Fasting Juvenile Trout
GFP	Green Fluorescent Protein
JT	Juvenile Trout
miARN	Micro-ARN
PAF	Paraformaldéhyde
PBS	Phosphate Buffer Saline
qPCR	Quantative Polymerase Chain Reaction
YFP	Yellow Florescent Protein
MRF	Facteurs de Régulation Myogénique

Introduction bibliographique

1.1. Introduction générale

Le rôle physiologique du muscle est de convertir l'énergie biochimique provenant de l'alimentation en énergie mécanique, afin d'assurer des fonctions essentielles à la survie, telles que la locomotion, la respiration et l'apport des nutriments vers tous les tissus de l'organisme.

Trouvées *in situ,* tout au long de la vie des vertébrés, les cellules souches adultes sont indifférenciées. Elles se définissent par leurs capacités à engendrer des cellules spécialisées par différenciation cellulaire et leurs capacités à se renouveler par prolifération dans l'organisme.

Les cellules souches musculaires sont observées en microscopie électronique pour la première fois en 1961 par Mauro (cf figure 1) et sont aussi appelées cellules satellites. Nommées ainsi de par leur localisation dans le tissu, elles se trouvent entre la fibre musculaire et la lame basale. Elles présentent un rapport nucléo-cytoplasmique élevé et constituent une réserve en précurseurs myogéniques du tissu musculaire des vertébrés. Les capacités d'engagement myogénique de ces cellules leur confèrent un rôle principal dans la croissance et la régénération du muscle squelettique adulte. D'autre part, le maintien du nombre de cellules satellites, dans un muscle âgé après des cycles de dégénérescence et de régénérescence, supporte également cette notion de capacité intrinsèque des cellules satellites à l'auto-renouvèlement (Bischoff and Heintz, 1994). En outre, une fraction isolée de cellules satellites est capable de reformer une population générale dotée des mêmes propriétés d'autorenouvèlement et de différenciation (Collins *et al*., 2005). Dans le tissu adulte ces cellules sont en quiescence, en phase G0, et donc sorties du cycle cellulaire. En réponse à des signaux de lésions, elles s'activent, prolifèrent et se différencient.

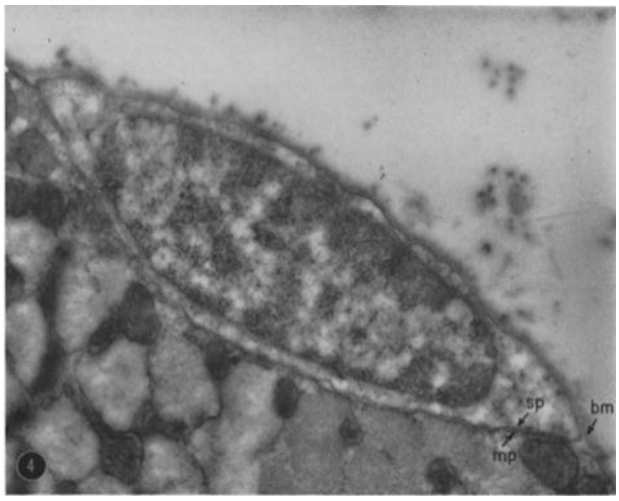

Figure 1 : Cellule satellite observée en microscopie électronique. Coupe transversale d'une fibre musculaire squelettique où l'on distingue une cellule satellite sous la lame basale (bm). Les membranes plasmiques de la cellule satellite (sp) et de la fibre musculaire (mp) sont donc juxtaposées. Grossissement x22000 (Mauro, 1961).

Un intérêt particulier est porté sur l'étude des mécanismes moléculaires régissant l'état d'activation ou de quiescence de ces cellules dans les modèles mammaliens. Toutefois, chez les poissons téléostéens, les voies moléculaires qui sous-tendent l'activation de ces cellules souches, restent peu connues.

Néanmoins, des cellules satellites ont été observées et des extractions ont été réalisées sur différentes espèces de poissons, telles que la truite (Greenlee *et al*., 1995; Fauconneau and Paboeuf, 2000a), la carpe (Koumans *et al*., 1993) ou le saumon (Bower and Johnston, 2009). La caractérisation de ces cellules en culture a révélé une élévation de l'expression de facteurs de régulation myogénique (MRF), tels que MyoD et la Myogenine (Rescan *et al*., 1994; Rescan *et al*., 1995). Chez la plupart des poissons de grande taille (saumon, carpe, truite), la croissance est continue puisqu'elle perdure tout au long de leur vie. La croissance musculaire post-larvaire des poissons est caractérisée par la contribution concomitante de deux processus : l'hypertrophie, retrouvée chez tous les vertébrés, qui désigne l'augmentation de taille des fibres musculaires déjà en place, et l'hyperplasie, spécifique des poissons, qui désigne la formation de nouvelles fibres (Mommsen, 2001).

Etant donné que les cellules satellites sont essentielles à la croissance musculaire, la persistance de la croissance hyperplasique des poissons implique vraisemblablement des propriétés intrinsèques spécifiques des précurseurs myogéniques. L'identification des mécanismes moléculaires et cellulaires caractéristiques des précurseurs myogéniques de la truite en croissance hyperplasique constitue l'objectif scientifique de la thèse.

1.2. Le tissu musculaire squelettique

1.2.1. Généralités

Le tissu musculaire représente l'un des tissus majoritaires des vertébrés et il a pour fonction d'assurer la contraction. Cette dernière est réalisée par des cellules hautement spécialisées : les cellules musculaires.

Les cellules musculaires sont des cellules plurinucléées fusiformes qui peuvent atteindre plusieurs centimètres de long. Elles sont entourées par l'endomysium, composé des constituants des lames basales, tels que le collagène de type IV, les laminines, l'entracine et le perlecan. Il s'y insère les plus fines ramifications nerveuses, capillaires et lymphatiques. Ces myofibres sont regroupées en faisceaux, séparés les uns des autres par un abondant tissu conjonctif lâche, le périmysium, qui contient des vaisseaux de plus grande taille, des nerfs et les fuseaux neuromusculaires. Plusieurs faisceaux sont réunis entre eux par l'épimysium, tissu conjonctif qui entoure tout le muscle. Chacune des deux extrémités d'une fibre musculaire s'insère sur un tendon. L'endomysium, le périmysium, l'épimysium et le tendon assurent le maintien structurel des myofibres. Le troisième tissu présent dans le muscle est le tissu adipeux. Il a une fonction de réserve énergétique et de thermorégulation chez les mammifères (tissu adipeux blanc et brun).Il se trouve principalement localisé en sous cutané mais également dans d'autres tissus comme le muscle (Gardan *et al*., 2006). Chez les poissons, on ne trouve que du tissu adipeux blanc, faisant office de réserve énergétique en sous cutané et dans le myoseptum (Bonnet *et al*., 2015).

L'anatomie des muscles des poissons diffère de celle des mammifères. Les cellules musculaires s'étendent sur toute la longueur séparant deux myoseptes et sont disposées

parallèlement à l'axe longitudinal, formant ainsi le myotome (figure 2). Le myosepte est un tissu conjonctif homologue à l'épimysium.

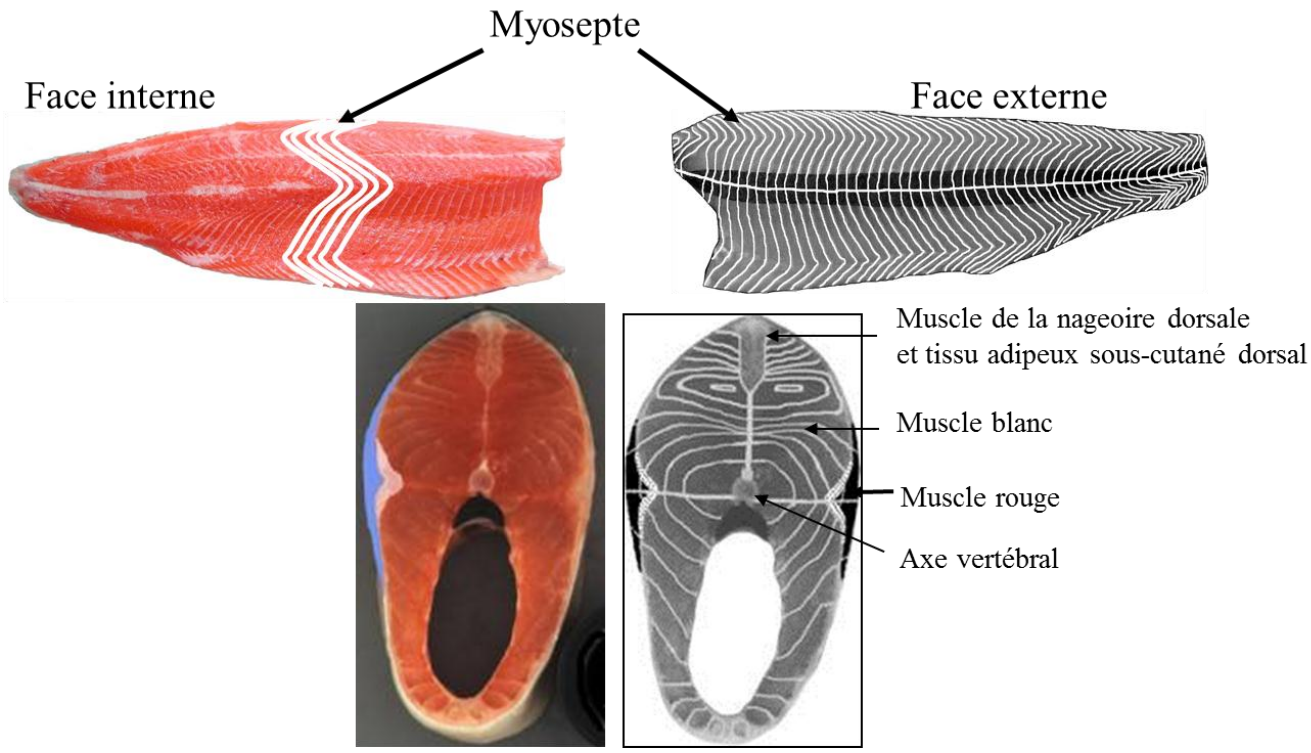

Figure 2 : Anatomie du muscle axial de la truite (adapté de Bugeon.J)

Les nombreux noyaux musculaire (myonucléi) du syncytium sont situés à la périphérie de la cellule, juste sous la membrane plasmique, mais parfois plus profondément entre les myofibrilles. Les noyaux ont une forme ovoïde ou allongée et ne se divisent pas dans une fibre musculaire mature.

Les cellules satellites sont localisées entre la membrane plasmique et la lame basale de la fibre. Elles mesurent de 18 à 50 µm de longueur. Leur noyau dense est formé d'une hétérochromatine abondante et leur cytoplasme est très réduit.

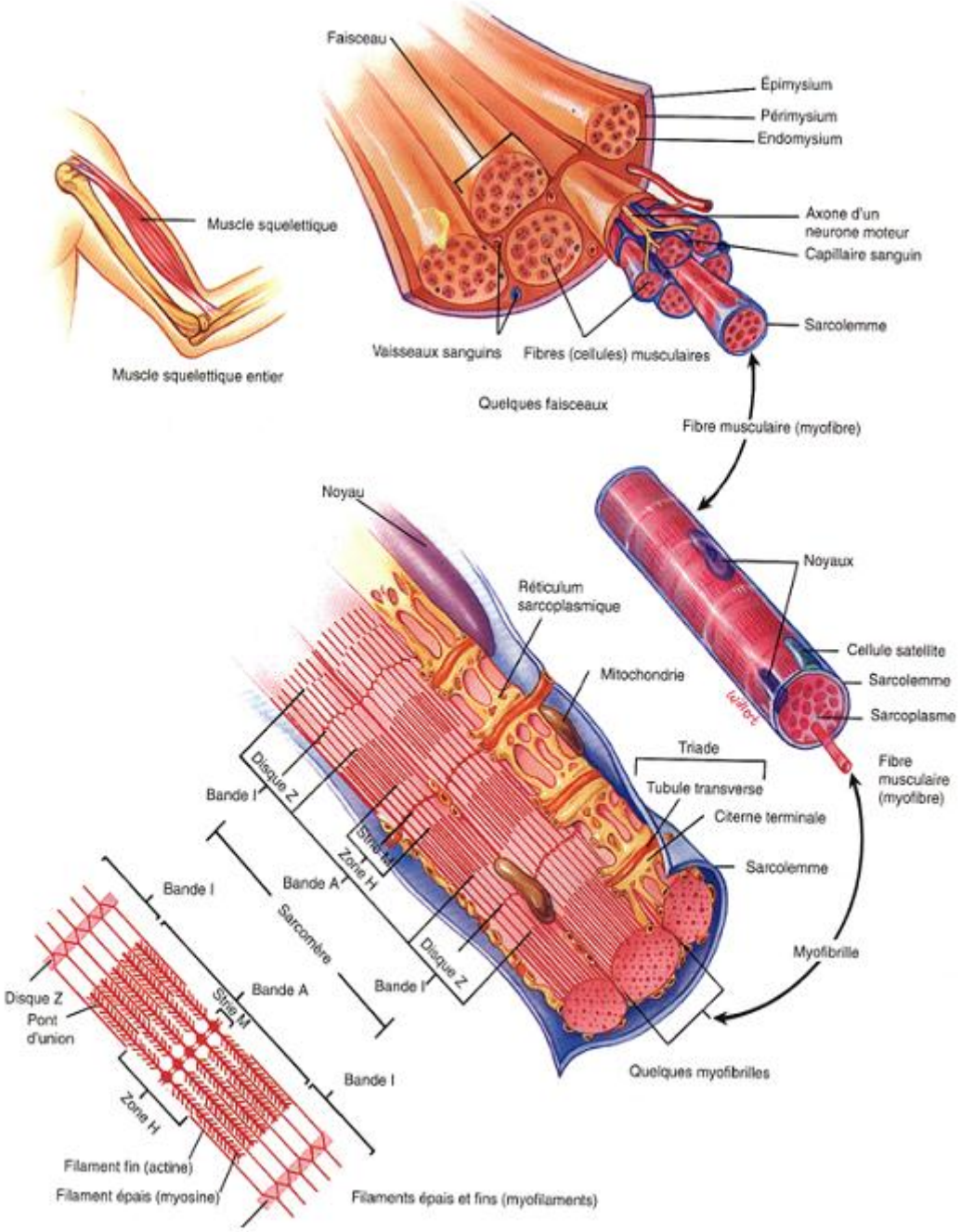

Figure 3 : Anatomie du muscle squelettique (Tortora and Grabowski, 1994)

Différents types de fibres composent le muscle squelettique

Le muscle squelettique de la plupart des vertébrés est composé de deux types de fibres disposées en mosaïque. Les fibres de type II, dites rapides, et les fibres de type I, dites lentes. Elles diffèrent, d'une part, par leur performance de contraction et, d'autre part, par leurs

voies métaboliques engagées pour la production énergétique. En effet, les fibres de type II ont un métabolisme glycolytique, alors que les fibres de types I ont un métabolisme oxydatif.

La particularité du myotome du poisson consiste en une séparation anatomique de ces types de fibres. Les fibres de type rapides, formant le muscle blanc, représentent environ 90% de la masse totale du filet. Celles-ci, dont la source d'énergie produisant l'ATP est le glycogène via le système anaérobique, sont peu vascularisées et contiennent peu de myoglobine et de mitochondries. Elles sont, par ailleurs, faiblement résistantes à la fatigue, mais parfaitement adaptées aux efforts importants tels que le nécessite la chasse ou la fuite. Le muscle rouge, situé à la surface du muscle blanc et dont la proportion varie selon les espèces, est composé des fibres lentes. Ces fibres oxydatives à contraction lente sont très vascularisées et contiennent beaucoup de myoglobine et de mitochondries. Le muscle rouge produit l'ATP via un métabolisme aérobique. Ces fibres sont résistantes à la fatigue et adaptées aux mouvements continus, telle que la nage stationnaire.

1.2.2. Le développement du muscle axial et des membres chez les amniotes et origine embryonnaire des cellules satellites

Les somites embryonnaires sont des sphères épithéliales dérivant de la segmentation récurrente, de l'avant vers l'arrière, du mésoderme paraxial. Des expériences utilisant des embryons chimériques caille-poulet montrent une origine somitique des cellules musculaires chez les amniotes (Armand *et al*., 1983). Les somites, provenant de l'embryon donneur de l'espèce caille, ont été transplantés dans un embryon receveur d'espèce poulet. Durant le développement embryonnaire, le devenir des cellules de caille fut suivi à l'aide d'un marquage antigénique caille. Il a été démontré ainsi que les cellules d'origine somitique de caille contribuaient à la formation des fibres musculaires différenciées et au pool de cellules satellites. Les muscles squelettiques axiaux et des membres dérivent donc des somites embryonnaires (Scaal and Christ, 2004). En position dorsale du somite embryonnaire, on trouve une structure épithéliale nommée dermomyotome. Il contient des précurseurs cellulaires présentant la capacité de donner les différents types cellulaires de la lignée mésodermique, incluant les fibroblastes, les cellules endothéliales, les muscles lisses des

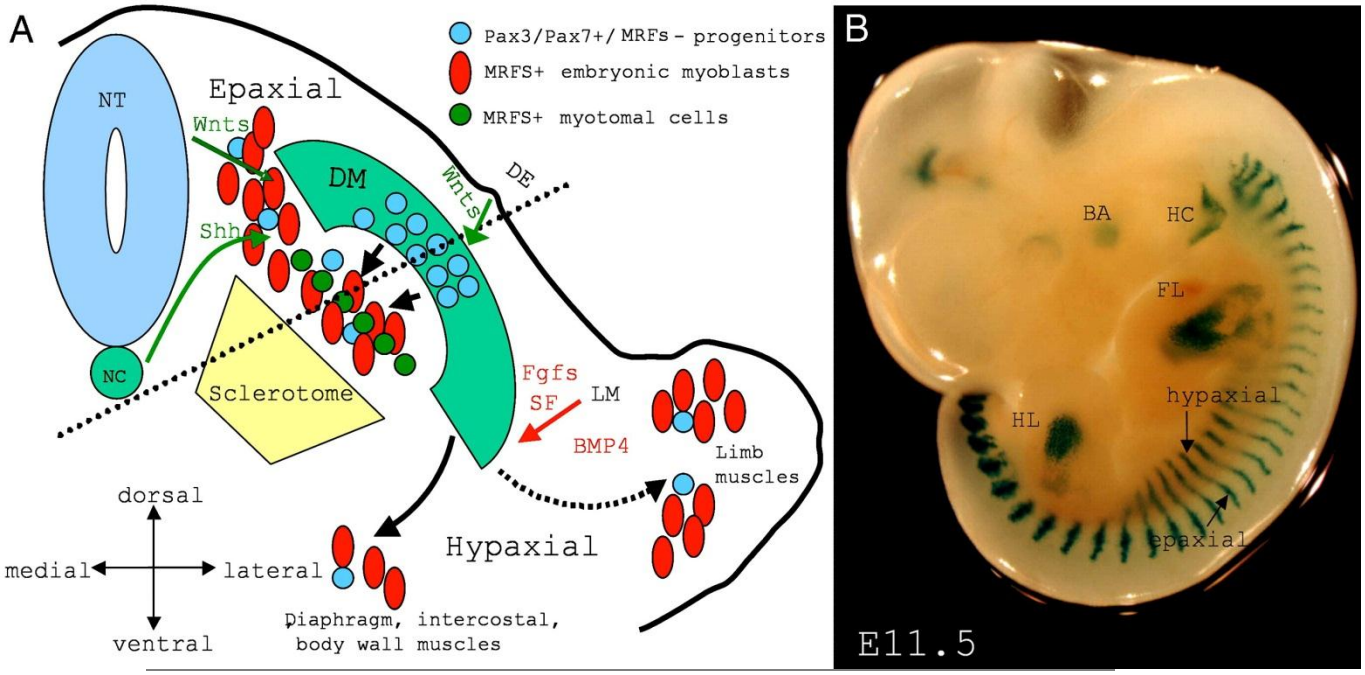

Figure 4 : Myogenèse chez la souris. (A) Modèle montrant les phases de la myogenèse : Les myoblastes embryonnaires génèrent le myotome. Les voies moléculaires intervenant dans la scission épaxial et hypaxial. La migration des progéniteurs du dermomyotome vers le myotome primaire.(B) Coloration X-Gal d'un embryon Myf5+/nlacZ E11.5 (Tajbakhsh et al., 1996). L'expression de la ß-Galactosidase marque les cellules progénitrices engagées dans le programme myogénique. Abréviations : DM dermomyotome ; NT tube neural ; NC notochord ; DE ectoderme dorsal ; LM mésoderme latéral ; MRFs facteurs de régulation myogénique ; BA arcs branchiaux , HC cordon hypoglossal ; FL membre supérieur ; HL membre inférieur (Biressi et al., 2007).

vaisseaux, du tissu adipeux brun et les cellules du muscle squelettique axial et des membres (Buckingham *et al*., 2003; Buckingham, 2006).

Afin d'effectuer le suivi spatio-temporel des progéniteurs musculaires au cours du développement, des lignées murines génétiquement modifiées ont été générées (Mansouri *et al*., 1996; Relaix *et al*., 2003, 2004; Kassar-Duchossoy *et al*., 2005). La formation du muscle embryonnaire se fait en deux phases chez les mammifères. Durant la première phase, les progéniteurs myogéniques exprimant les facteurs de transcription Myf5 et Mrf4, qui ont migré du dermomyotome, forment le myotome primaire (figure 4) situé en dessous (Kassar-Duchossoy *et al*., 2005). Aussi, les embryons murins, pour lesquels a été réalisé le knock-out de Myf5 ne présentent pas de myotome, et l'arrêt du développement embryonnaire se produit au stade E11.5 (Kassar-Duchossoy *et al*., 2005).

Au cours de la deuxième phase de la myogenèse, le dermomyotome subit une transition épithélio-mésenchymateuse (EMT). Une régionalisation entre le domaine hypaxial et épaxial du somite sous-tendra le devenir et l'engagement des cellules du dermomyotome. Différentes molécules de signalisation telles que les FGF, les BMP et le facteur de diffusion (SF) sont connues pour réguler ces événements (Biressi *et al*., 2007b). Tandis que les progéniteurs du domaine dorso-médial du myotome/dermomyotome donneront naissance aux muscles épaxiaux (dos). Les progéniteurs du domaine ventro-latéral donneront les muscles hypaxiaux (membres). Le suivi spécifique des progéniteurs exprimant Pax3 réalisé par suivi d'expression du gène rapporteur codant la GFP illustre ce phénomène (Schienda *et al*., 2006). Cette étude a montré que les cellules satellites des membres dérivent du somite hypaxial (Schienda *et al*., 2006). Par la suite, une étude a montré que les cellules somitiques Pax3+Pax7- sont requises pour la myogénèse embryonnaire, tandis que les cellules somitiques Pax7+, dérivées des cellules Pax3+, sont requises pour la myogenèse fœtale des membres (Hutcheson *et al*., 2009). Enfin, après l'EMT, les précurseurs musculaires exprimant Pax3 et Pax7 qui migrent de la région centrale du dermomyotome vers le myotome primaire, donneront les cellules satellites (Gros *et al*., 2005; Kassar-Duchossoy *et al*., 2005; Relaix *et al*., 2005; Schienda *et al*., 2006; Yin *et al*., 2013). En effet, à l'aide du gène rapporteur codant la GFP, ces cellules Pax3 et Pax7 positives ont été suivies (Relaix *et al*., 2005). Ce qui a permis de montrer qu'à la fin de la période fœtale, ces cellules se logent entre la fibre en développement et la lame basale, et deviendront les cellules satellites après la naissance (Relaix *et al*., 2005). Outre leur capacité de prolifération, ces cellules satellites sont également capables de sortir du cycle cellulaire et de commencer une différenciation myogénique. Ces cellules, engagées dans le programme de différenciation, exprimeront alors les facteurs de régulation myogénique, MyoD et Myf5 puis la Myogénine (Sabourin Luc A and Rudnicki Michael A, 2001).

1.2.3. Le développement du muscle axial chez les poissons et origine embryonnaire des cellules satellites

La mise en place du tissu musculaire au cours du développement chez les poissons se fait en trois étapes (Steinbacher *et al*., 2007). La première phase est la myogenèse primaire, durant

laquelle se forme le myotome primaire. La seconde phase correspond à la myogenèse, dite stratifiée, pendant laquelle les précurseurs myogéniques provenant de l'épithélium externe du myotome vont coloniser, sous forme de strates, le muscle en formation. Enfin, la troisième phase est la myogenèse mosaïque, où l'on observe la formation éparse de nouvelles fibres dans tout le myotome. Cette dernière phase de la myogenèse sera développée dans le chapitre dévolu à la croissance musculaire post-larvaire.

Comme chez les amniotes, le mésoderme paraxial s'allonge au cours de l'embryogénèse et est à l'origine des somites chez les poissons. Cependant le développement musculaire des poissons diffère de celui des amniotes.

En effet, il y a une ségrégation précoce des lignages cellulaires qui donneront le muscle lent, périphérique, et le muscle rapide, profond. L'utilisation de colorants vitaux couplés à une immunolocalisation des myosines spécifiques des fibres lentes a montré que celles-ci étaient issues de la différenciation d'une population cellulaire spécifique. Il s'agit des cellules adaxiales, de forme cuboïde initialement situées dans la région profonde du somite (Devoto *et al*., 1996). Ces cellules sont les premières à exprimer les MRF, et plus particulièrement MyoD. Ce facteur de transcription est exprimé par les cellules adaxiales avant la formation des somites. Les fibres lentes du myotome embryonnaire résultent de la différenciation de ces cellules adaxiales. Les cellules occupant la moitié postérieure du somite contribueront à la formation des fibres rapides du myotome embryonnaire.

Les cellules de la moitié antérieure du somite, quant à elles, vont migrer vers la surface latérale du somite et vont recouvrir le myotome primaire pour former un épithélium externe, de structure semblable au dermomyotome observé chez les mammifères (Hollway *et al*., 2007; Stellabotte and Devoto, 2007). En outre, il a été rapporté une expression de Pax3 et Pax7 par les cellules de cet épithélium externe (Devoto *et al*., 2006; Hollway *et al*., 2007). L'examen histologique et le suivi de ces cellules par immuno-marquage (Pax7, Myogenine, MEF2, Desmine, PCNA) a conduit à émettre l'hypothèse selon laquelle les cellules, qui vont ensuite migrer de l'épithélium externe vers le myotome embryonnaire, résulteraient d'une dé-épithélialisation des lèvres ventrale, dorsale et caudale (Steinbacher *et al*., 2008).

Ainsi, l'épithélium externe est une structure analogue au dermomyotome des amniotes. Cependant, chez les poissons, les cellules adaxiales et les cellules de la partie postérieure du

somite donne le myotome embryonnaire, alors que ce dernier dérive du dermomyotome chez les mammifères.

1.2.4. Autres origines possibles des cellules satellites dans le muscle squelettique adulte

Si la majeure partie des cellules satellites sont issues du dermomyotome chez les amniotes (cf §2.3), des observations tendent à montrer une origine alternative pour une partie des cellules satellites adultes.

Un explant d'aorte dorsale embryonnaire en culture peut, par exemple, donner des cellules capable de former des myotubes *in vitro* (De Angelis *et al*., 1999). Ces cellules sont similaires aux cellules satellites d'un point de vue morphologique et du point de vue de l'expression des marqueurs moléculaires. Sachant que les cellules satellites adultes expriment également les marqueurs endothéliaux, il fut proposé qu'un certain nombre de cellules satellites soient originaires de l'aorte dorsale embryonnaire (De Angelis *et al*., 1999). Cependant, puisque les muscles lisses de l'aorte dorsale dérivent du mésoderme paraxial (Esner *et al*., 2006), cette similarité d'expression peut simplement s'expliquer par cette origine mésodermique commune.

Différentes études ont, par la suite, démontré que d'autres types cellulaires présentaient une capacité à coloniser la niche satellitaire et participer au processus de régénération, lorsqu'elles sont transplantées au sein du tissu lésé. Une population spécifique de cellules endothéliales (les péricytes), notamment, peuvent se différencier en précurseurs myogéniques et participer au développement des muscles des membres (Dellavalle *et al*., 2011). Par ailleurs, un autre type de cellules (cellules PIC) présentant de fortes potentialités myogéniques et ne partageant pas la même origine embryonnaire que les cellules satellites a été décrite. En effet, les cellules PIC sont localisées dans le compartiment interstitiel du muscle, en dehors des lames basales recouvrant les myofibres (Mitchell *et al*., 2010). Contrairement aux cellules satellites, ces cellules n'ont jamais exprimé Pax3 et donc ne dérivent pas du dermomyotome embryonnaire. Pourtant, ces cellules PIC sont capables de former des myotubes *in vitro* et l'invalidation du gène codant Pax7 empêche ces cellules de

s'engager dans le programme de différenciation (Mitchell *et al*., 2010). De même, une seconde population cellulaire du compartiment interstitiel présentant une potentialité myogénique a été caractérisée. Il s'agit des cellules exprimant twist2, capables de se différencier *in vitro* et de fusionner entre elles et avec des cellules satellites pour former des myotubes (Liu *et al*., 2017). Ces cellules contribueraient à la formation spécifique des fibres de type IIB durant la croissance après la naissance et la régénération musculaire (Liu *et al*., 2017). Néanmoins, en conditions physiologiques, le niveau d'implication de ces différentes populations cellulaires, au sein du pool satellitaire du muscle adulte et dans le développement musculaire, reste, malgré tout, largement discuté.

1.2.5. La croissance post-larvaire chez les poissons : hypertrophie et hyperplasie

Lorsque l'on se penche sur les caractéristiques de la croissance musculaire chez les vertébrés, les poissons occupent une place bien particulière. En effet, la majorité des poissons ont une croissance continue. Nous avons précédemment détaillé les deux premières phases de la myogenèse, la formation du myotome et la myogenèse stratifiée (cf§1.2.3). La troisième phase de la myogenèse est la myogenèse mosaïque. Elle commence au stade larvaire (variable selon les espèces) et dure jusqu'au stade adulte (Rescan, 2008; de Almeida *et al*., 2010). Au cours de cette phase, spécifique des poissons à croissance continue, de nouvelles fibres musculaires se forment de manière éparse dans tout le myotome.

La croissance musculaire post-larvaire des poissons est ainsi caractérisée par la contribution concomitante de deux processus : l'hypertrophie, retrouvée chez tous les vertébrés, qui désigne l'augmentation de taille des fibres musculaires, et l'hyperplasie, qui désigne la formation de nouvelles fibres (Mommsen, 2001). Cette croissance hyperplasique est un processus physiologique qui décroît en fonction de l'âge de l'animal. En effet, en suivant l'évolution de la répartition des tailles de fibres (figure 5), il a été montré que la truite de 71 cm de longueur ne présente plus de fibres d'un diamètre inférieur à 40 µm. La carpe, quant à elle présente une croissance hyperplasique jusqu'au poids de 130 grammes. A partir de 200 grammes les animaux ne présentent plus de fibres musculaires de diamètre inférieur à 30 µm

mais augmentent leurs tailles moyennes des fibres, signe d'une croissance hypertrophique (Rowlerson *et al*., 1995).

Chez la truite, la génération d'un modèle transgénique exprimant la GFP sous le contrôle du promoteur de la Myogénine, a permis de visualiser les fibres nouvellement formées à différents stades de croissance de l'animal (Rescan *et al*., 2015). Les résultats de cette étude ont montré une diminution des fibres GFP positives et donc une diminution de la croissance hyperplasique avec l'âge jusqu'à son arrêt vers 18 mois (figure 6).

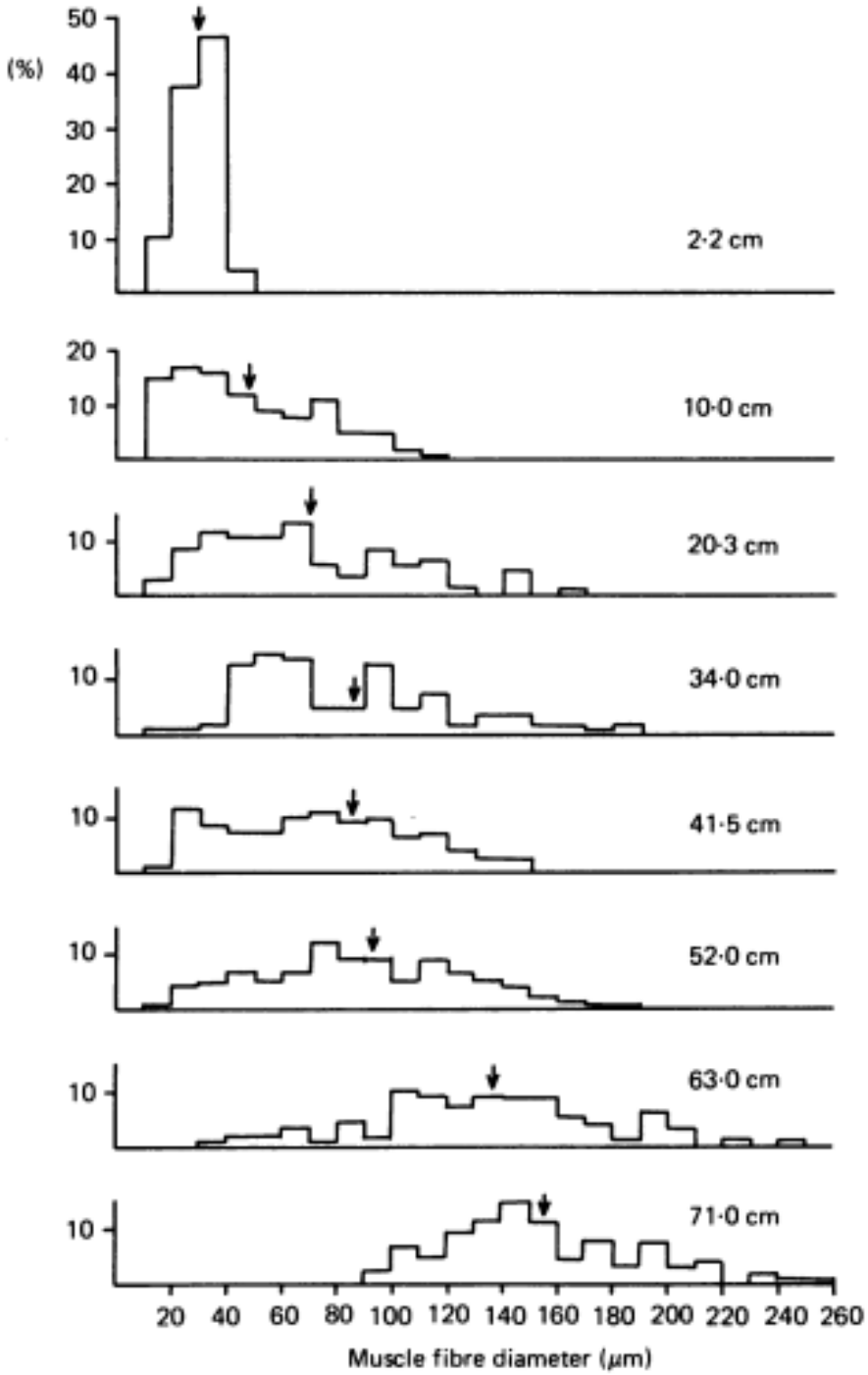

Figure 5 : Répartition de la taille des fibres du muscle rapide en fonction de la taille de la truite. Les flèches présentent les diamètres moyens des fibres du muscle rapide selon l'âge de l'individu. La proportion en fibres de faibles diamètres (<40µm) diminue avec l'âge, tandis que la proportion en fibres de diamètres élevés (>120µm) augmente (Stickland, 1983).

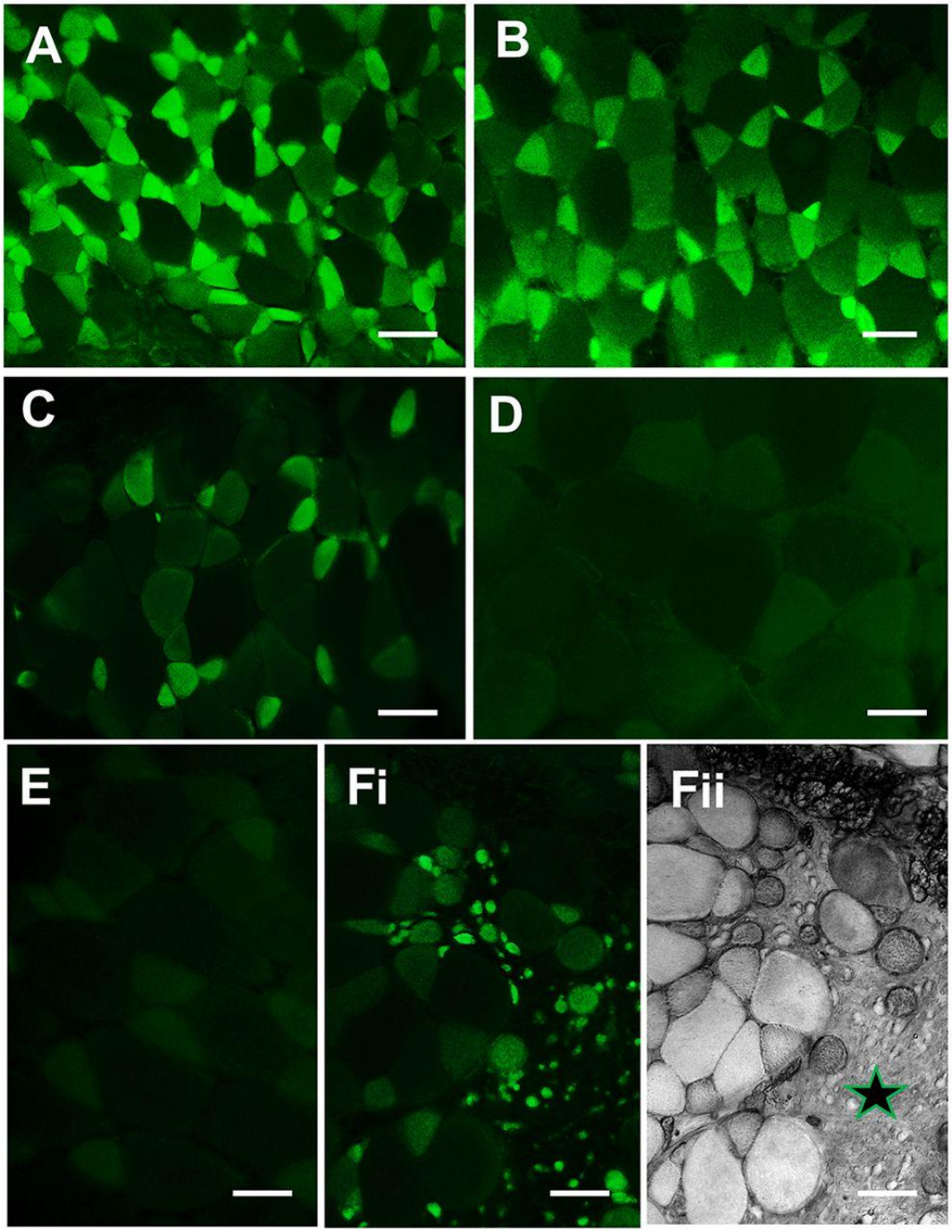

Figure 6 : Expression de GFP chez les truites transgéniques juvéniles et adultes. (A-E) Coupe transversale du myotome épaxial de truite âgée de (A) 8, (B) 12, (C) 15, (D) 18 et (E) 24 mois. Les myofibres naissantes fluorescentes diminuent avec l'âge. (Fi,Fii) Coupe transversale à travers une zone lésée du muscle chez une truite transgénique de 24 mois, 20 jours après la lésion : (Fi) lumière ultraviolette - la fluorescence GFP est présente dans les fibres de petit diamètre ; (Fii) lumière blanche - l'étoile indique le tissu conjonctif formé au site de la lésion. Barres d'échelle : A-D, 100 µm ; E, Fi et Fii, 70 µm.(Rescan et al., 2015)

1.3. Les cellules satellites

1.3.1. Généralités

La cellule souche musculaire assure l'homéostasie tissulaire, c'est-à-dire le maintien de la fonction musculaire. Les grandes capacités régénératives du muscle font des précurseurs myogéniques un modèle cellulaire extrêmement étudié pour la compréhension des mécanismes associés à la régénération chez les mammifères. D'autre part, l'amélioration des connaissances visant à démontrer l'implication des précurseurs myogéniques dans la croissance musculaire en général des poissons d'intérêt aquacole, à croissance continue, constitue également un enjeu agronomique.

Chez l'adulte, les cellules satellites *in vivo* sont en quiescence mais peuvent entrer dans le cycle cellulaire après activation et procéder à l'auto-renouvèlement ou commencer le programme de différenciation myogénique. Les précurseurs myogéniques prolifèrent et se différencient. Ils assurent, de cette manière, le renouvellement et/ou la formation des fibres musculaires. Toutes les cellules satellites expriment le facteur de transcription Pax7. Les souris déplétées du gène codant Pax7 possède un tissu musculaire ayant des fibres plus petites. Il en résulte une faiblesse musculaire générale et une perte de 2/3 de la masse par rapport aux souris sauvages (Seale *et al*., 2000). Plus qu'un simple marqueur cellulaire, Pax7 est donc nécessaire au maintien des cellules satellites, à leur viabilité et à la genèse des précurseurs myogéniques qui exprimeront les facteurs de transcription tels que Myf5 et MyoD. Pax7 régule, en effet, l'expression des gènes codant ces facteurs de transcription, nécessaires à l'engagement myogénique des cellules. Les cascades d'expression, finement régulées, vont ainsi permettre aux cellules d'être successivement activées et progressivement différenciées jusqu'à acquérir la capacité de fusion pour former des myotubes (cf figure 7).

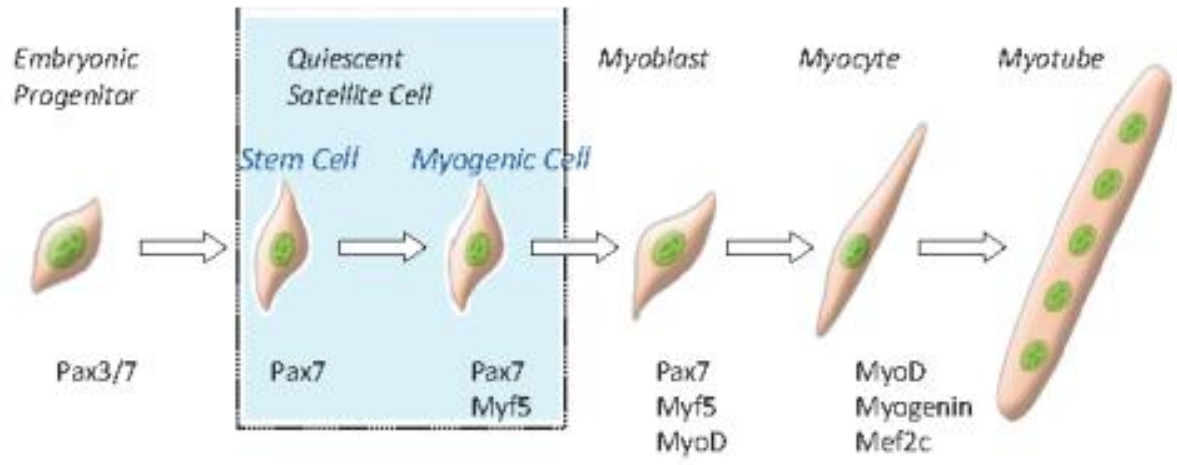

Figure 7 : Profil transcriptionnel des progéniteurs musculaires dans la myogenèse. Chez les mammifères, après la naissance, la cellule satellite quiescente exprime le facteur de transcription Pax7. Une fois activé, le précurseur myogénique exprime les facteurs de régulation myogénique Myf5 et MyoD. Les cellules différenciées en myocytes expriment la Myogénine et fusionnent entre-elles ou avec des myotubes afin de former des cellules plurinuclées, les myofibres ***(Rudnicki et al., 2008).***

1.3.2. Hétérogénéité phénotypique des cellules satellites

Dans un premier temps, les cellules satellites ont été considérées comme une population homogène de précurseurs myogéniques (Bischoff and Heintz, 1994). Toutefois, depuis quelques années, les études réalisées afin de caractériser ces cellules, ont complexifié le schéma établi initialement. Il existe une hétérogénéité phénotypique et fonctionnelle des cellules satellites selon les muscles dont elles proviennent, observée notamment chez la souris (Randolph and Pavlath, 2015).

Dans la plupart des études consacrées à la caractérisation des cellules satellites chez les mammifères, ces cellules sont extraites et isolées sur la base de l'expression de Pax7. Néanmoins, ces populations cellulaires présentes une hétérogénéité expressionnelle. En effet, une faction cellulaire va exprimer Pax3, paralogue de Pax7 (Montarras *et al.*, 2005 ; Relaix *et al.*, 2006). La proportion de cette sous population, co-exprimant Pax3 et Pax7, est d'ailleurs variable selon le muscle observé (Relaix *et al.*, 2006). Plus récemment, une étude d'expression génique sur cellule unique a permis d'étudier le niveau d'expression de Pax7, Pax3, Myf5 et MyoD sur une quarantaine de progéniteurs, isolés du muscle par FACS, selon l'expression des marqueurs cellulaires (CD45-/CD11b-/CD31-/Sca1-/α7-integrine+/CD34+)

(Sacco *et al*., 2008). Toutes ces cellules expriment Pax7 et Myf5, ce qui confirme leur appartenance à la population des précurseurs myogéniques. Seulement, 12% de ces cellules expriment Pax3, et 25% de ces cellules expriment MyoD (Sacco *et al*., 2008). De plus, par marquage en immunofluorescence sur fibres isolées de souris, dont l'expression du gène codant Myf5 est suivie par un gène rapporteur LacZ , une équipe a démontré que 13% des cellules satellites n'expriment pas Myf5 (lacZ négative) dans le muscle EDL (Kuang *et al*., 2007). Myf5 étant un facteur de régulation myogénique, l'absence d'expression de Myf5 par les cellules satellites LacZ- suggère qu'elles seraient moins engagées dans le programme de différenciation myogénique. Néanmoins, la construction d'un système Myf5-Cre/ROSA-YFP nuance cette dernière conclusion (Kuang *et al*., 2007). Ces auteurs utilisent des souris génétiquement modifiées pour que la protéine Cre s'exprime lorsque Myf5 est exprimé et, possédant un gène rapporteur (YFP), flanqué des séquences Loxp sous contrôle d'un promoteur ubiquitaire ROSA26. Ainsi, la protéine YFP s'exprime dans les cellules qui expriment, ou ont déjà exprimé, Myf5. Les résultats montrent que 90% des cellules Pax7 positives expriment, ou ont déjà exprimé, Myf5. Cela offre ainsi, une vision plus dynamique du destin cellulaire *in vivo*, de l'activation et de la quiescence des cellules satellites (Kuang *et al*., 2007). Une nouvelle sous-population a été décrite en se basant sur l'expression de la doublecortine. En effet, l'expression de la doublecortine (Pax7+/MyoD-) est détectée, dans une population de précurseurs myogéniques, à un moment précis du processus de régénération, suggérant le rôle spécifique de ces cellules dans la maturation des fibres néoformées (Ogawa *et al*., 2014). Aussi, il a été démontré des différences, en termes de potentiels de différenciation et de migration, entre les cellules satellites, selon l'âge des individus et les muscles dont elles sont extraites (Collins-Hooper *et al*., 2012). Enfin, deux populations de cellules satellites ont été décrites selon leur niveau d'expression de Pax7 : les cellules exprimant fortement Pax7 sont également fortement quiescentes, alors que la population exprimant faiblement Pax7 prolifère et se différencie plus rapidement (Rocheteau *et al*., 2012). Lors de la division cellulaire, la fraction cellulaire qui exprime fortement Pax7 va procéder à une ségrégation hiérarchique de ces brins d'ADN. Tandis que la cellule fille possédant les brins d'ADN parentaux conservera le phénotype souche de la cellule satellite quiescente. La cellule fille possédant les brins d'ADN néo-synthétisés s'engagera, elle, dans le programme de différenciation myogénique. Par opposition, la fraction cellulaire exprimant faiblement Pax7 procède à une ségrégation aléatoire des brins d'ADN parentaux et néo-

synthétisés et engendre des cellules filles plus engagées dans le programme de différenciation myogénique (Rocheteau *et al*., 2012). Ainsi, l'une des caractéristiques essentielles des cellules satellites réside dans leur capacité à effectuer des divisions symétriques et asymétriques qui leur permettent de maintenir un pool satellitaire tout en participant à l'hypertrophie et l'hyperplasie musculaire.

L'ensemble de ces études dévoile une hétérogénéité phénotypique dynamique des précurseurs myogéniques qu'il est nécessaire de prendre en compte pour appréhender l'action des cellules satellites.

1.3.3. Un mécanisme cellulaire des cellules satellites : la division asymétrique

La faculté d'effectuer des divisions symétriques et asymétriques constitue une particularité essentielle des cellules satellites. L'hypothèse d'une polarité cellulaire a été établie par l'implication des cadhérines, dans les jonctions cellules-cellules, et l'implication des intégrines, dans les jonctions cellules-matrice extracellulaire, influant l'organisation du cytosquelette et l'orientation de la cellule (Yonemura *et al*., 1995; Kobielak and Fuchs, 2004). L'orientation relative des cellules souches, par rapport à la lame basale, constitue l'élément déterminant quant à la nature de la division : symétrique ou asymétrique. En effet, une division cellulaire parallèle au plan de la lame basale est dite symétrique et génère deux cellules filles identiques. A l'inverse, les divisions cellulaires dans l'axe perpendiculaire, par rapport à la lame basale, produisent deux cellules filles distinctes, l'une, contre la lame basale et identique à la cellule mère, l'autre, du côté apical et engagée dans le processus de différenciation (Tumbar *et al*., 2004) (cf figure 8). La division asymétrique est caractérisée par une distribution asymétrique des protéines impliquées dans la polarité cellulaire et dans l'engagement myogénique, et par une orientation apico-basal de l'axe mitotique.

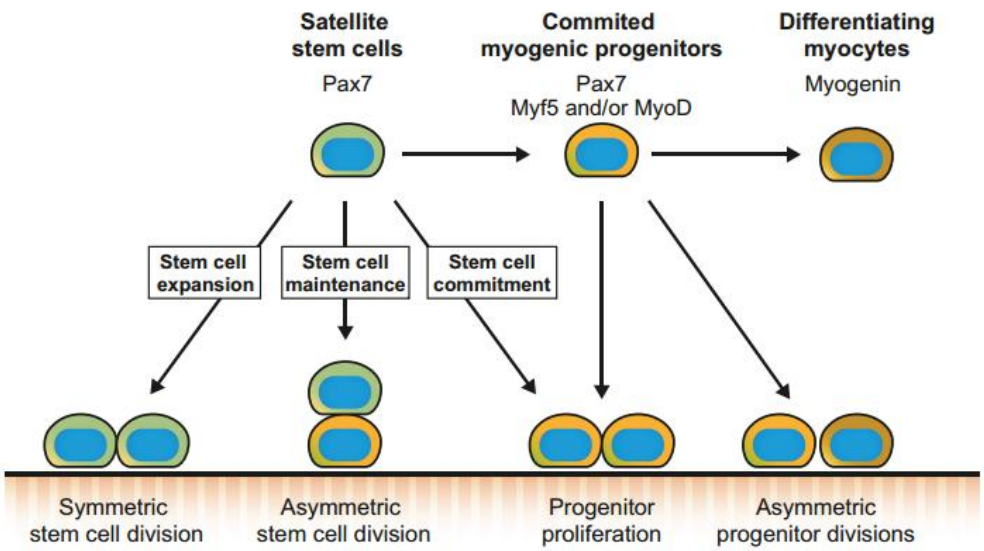

Figure 8 : Devenir des cellules satellites in vivo. Les cellules satellites activées (Pax7 +, Myf5 -, MyoD -) peuvent subir des divisions symétriques pour accroître la population de cellules souches, ou des divisions asymétriques pour maintenir la population de cellules souches. Les cellules satellites peuvent aussi s'engager directement dans la myogenèse et fournir des progéniteurs myogéniques (Pax7 +, Myf5 + et/ou MyoD +) qui vont se différencier en myocytes (Myog +) (Dumont et al, 2015a).

Lors de la mitose, Par1 (Mark2) phosphoryle Pard3 (Par3). Par1 est alors localisé au pôle basal de la cellule et Pard3 au pôle apical. La phosphorylation de Pard3 induit l'activation du complexe protéique PAR (Pard3, Par6, aPKC). Du coté apical de la cellule, en fin de division, le complexe PAR activé phosphoryle et active la voie p38α/β MAPK, induisant l'expression de MyoD (Cosgrove *et al*., 2014). La cellule, du côté apical, s'engage vers le processus de différenciation myogénique, alors que la cellule, du côté basal, préserve les caractéristiques de la cellule satellite souche. Récemment, une étude a montré l'importance du complexe associé à la dystrophine dans la mise en place de l'axe mitotique apico-basal et, de fait, dans la régulation de la polarité des cellules satellites. Aussi, les cellules satellites murines privées des gènes codant la dystrophine, ou Pard3, présentent une baisse de divisions asymétriques et une réduction des capacités à générer les précurseurs myogéniques (Dumont *et al*., 2015b). Dans la même année, une autre équipe a souligné l'importance de la polarité cellulaire sur la mise en place de cet axe mitotique et dans l'activité des cellules satellites dans un processus de régénération. Leurs travaux ont montré une distribution asymétrique du

granulocyte colony-stimulating factor receptor (G-CSFR) dans les cellules satellites activées. Cette étude révèle qu'un traitement au G-CSF accroît la régénération via l'activation des cellules satellites chez une souris mdx, jouant un rôle dans l'engagement myogénique (Hayashiji *et al*., 2015). Enfin, médiée par le complexe PAR, la répartition asymétrique du ligand Delta1 de Notch du côté basal dans la cellule fille la plus engagée vers la voie de différenciation, d'une part, et, du récepteur Notch 3, du côté apical de la cellule fille la moins engagée dans le programme de différenciation myogénique, d'autre part, suggère une communication juxtacrine par la voie Notch pour le maintien de l'état progéniteur de la cellule en position basale (Cosgrove *et al*., 2009; Dumont *et al*., 2015b). L'activation de la voie Notch entraine l'expression du gène HES permettant la répression de MyoD (Iso Tatsuya *et al*., 2003). Numb, protéine cytoplasmique et ligand antagoniste du récepteur Notch (Conboy and Rando, 2002), est, par ailleurs, relocalisée au pôle apical de la cellule en division asymétrique (Cosgrove *et al*., 2009; Dumont *et al*, 2015a).

1.3.4. Implication des cellules satellites dans la croissance hypertrophique

Chez l'adulte, les cellules satellites du muscle squelettique sont quiescentes (Shinin *et al*., 2006). Il semble admis, par la communauté scientifique spécialisée, que les noyaux des fibres ne sont pas capables d'effectuer des divisions. L'augmentation du nombre de noyaux, observée durant la croissance hypertrophique, résulte donc probablement de la fusion des précurseurs myogéniques avec la myofibre en croissance. Chez la souris au stade néonatal, la proportion des cellules satellites représente 30 à 35% des noyaux sous-laminaires. Leur cycle cellulaire moyen a été évalué à 32h avec une phase S de 14h (Schultz, 1996). Après la naissance et durant la croissance, cette proportion en cellules satellites décroît, tandis que la proportion en noyaux dans les fibres s'accroît.

L'invalidation du gène codant Pax7 induit la suppression d'environ 80% des cellules satellites chez la souris (Seale *et al*., 2000). La plupart de ces animaux meurent 2 semaines après la naissance et présentent des fibres musculaires plus petites avec moins de noyaux. Ces résultats ont mis en évidence que les cellules satellites sont nécessaires à la croissance post-natale. Or, la croissance post-natale chez les mammifères est réalisée essentiellement par la croissance hypertrophique (Ontell and Kozeka, 1984; White *et al*., 2010). Chez la truite

comme chez les mammifères, il existe une relation linéaire entre l'augmentation de la taille des fibres et l'augmentation du nombre de noyaux par fibres (Johnston *et al*., 2003a). Des expériences utilisant la thymidine tritiée ont montré que les cellules satellites du muscle de la souris juvénile prolifèrent et contribuent à la croissance musculaire par fusion avec les myotubes en formation (Schultz, 1989). De plus, une étude récente a démontré que la perte de la compétence de fusion par invalidation du gène codant Myomaker dans les cellules satellites impactait négativement l'hypertrophie (Goh and Millay, 2017). Ainsi, l'ensemble de ces études souligne que les cellules satellites sont nécessaires et que leur activation est prépondérante à la croissance hypertrophique post-natale.

Une hétérogénéité fonctionnelle des cellules satellites dans le processus de croissance a, par ailleurs, été mise en lumière par d'autres travaux. En effet, deux sous populations de cellules satellites ont été identifiées dans le muscle en croissance (Schultz, 1996) : (i) une population majoritaire, d'environ 80% de la population des cellules satellites, ayant un cycle cellulaire rapide; et (ii), une sous population, dont la division cellulaire est beaucoup plus lente, présentant une incorporation du BrdU retardée. De façon intéressante, les auteurs suggèrent la présence d'une population satellitaire dédiée à l'auto-renouvèlement et une autre dédiée à la différenciation. Une étude est allée plus loin sur cette hétérogénéité fonctionnelle en montrant que les précurseurs myogéniques extraits du muscle à cycle cellulaire lent étaient plus prompts à fusionner entre eux *in vitro* et *in vivo*. A l'inverse, les précurseurs myogéniques extraits du muscle à cycle cellulaire rapide étaient plus prompts à fusionner avec des myotubes pré-existants *in vitro* et *in vivo* (Rouger *et al*., 2004). Ce constat suggère ainsi une hétérogénéité entre les cellules satellites dédiées à la croissance hypertrophique (majoritaires chez les mammifères) et l'hyperplasie.

Cependant, une croissance hypertrophique sans accrétion myonucléaire est possible (McCarthy *et al*., 2011). En effet, chez les mammifères, l'exercice permet d'induire une hypertrophie des fibres musculaires. La participation des cellules satellites, durant cette croissance hypertrophique induite, semble flexible et dépendre du muscle et de l'âge de l'animal. En effet, la réduction de 90 % des cellules satellites dans le muscle squelettique mature n'a pas affecté l'hypertrophie et l'augmentation de la force du muscle consécutive de l'exercice (McCarthy *et al*., 2011). Cette étude montre qu'il est possible d'observer une

croissance hypertrophique induite sans implication des cellules satellites. En effet, l'accumulation des protéines dans les myofibres permettrait une croissance hypertrophique sans intervention des cellules satellites (Wang and Rudnicki, 2011; Pallafacchina *et al*., 2013). Par ailleurs, le dialogue croisé complexe entre les myofibres et les cellules satellites permet une régulation fine de l'activité des cellules satellites (quiescence, activation, senescence). En effet, l'oncostatine M est sécrétée dans la niche satellitaire par la myofibre. Elle participe, ainsi, au maintien en quiescence des cellules satellites (Sampath *et al*., 2018). La délétion du facteur de réponse sérique (SRF), spécifiquement dans les myofibres et non dans les cellules satellites, réduit l'hypertrophie des fibres et la prolifération des cellules satellites chez la souris juvénile (Guerci *et al*., 2012). Enfin, l'interleukine-6, également sécrétée par la myofibre, stimule la prolifération et la migration des précurseurs myogéniques. L'inhibition de l'expression de l'IL-6 affecte l'accrétion myonucléaire et l'hypertrophie induite *in vivo* (Serrano *et al*., 2008).

Ainsi, l'implication des cellules satellites dans la croissance hypertrophique induite est vivement débattue, notamment, du fait de l'utilisation d'un même modèle murin donnant des résultats contradictoires selon les muscles et l'âge des animaux (McCarthy *et al*., 2011; Egner *et al*., 2016). Un débat entre ces auteurs sur les biais méthodologiques des deux études a été proposé et nuance les deux propos (Egner *et al*., 2017; McCarthy *et al*., 2017). L'ensemble de ces études traduit la complexité à établir un schéma général sur l'implication active (ou non) des précurseurs myogéniques dans la croissance hypertrophique induite ainsi que les mécanismes cellulaires et moléculaires associés.

1.3.5. Implication des cellules satellites dans la croissance hyperplasique

Bien qu'il soit largement admis, chez les poissons, que les cellules satellites sont impliquées dans la croissance hyperplasique, seules quelques études, portant sur la croissance hyperplasique post-larvaire, suggèrent une implication des cellules satellites (figure 9). Chez la truite, l'étude des différentes phases de la myogenèse montre une expression de MyoD et de la Myogénine dans les progéniteurs musculaires au cours de la croissance hyperplasique mosaïque (Steinbacher *et al*., 2007). Au cours de cette phase, spécifique des poissons à croissance continue, les progéniteurs musculaires prolifèrent et de nouvelles fibres

musculaires se forment de manière éparse dans tout le myotome. Des expériences de co-marquage c-met et PCNA suggèrent une activation des précurseurs myogéniques après une reprise alimentaire (Brodeur *et al*., 2003).

Plus récemment, il a été montré chez le poisson zèbre que les cellules satellites sont impliquées dans la formation des nouvelles fibres musculaires, lors de la régénération musculaire (Berberoglu *et al*., 2017). Malgré ces résultats convergents, des études restent à réaliser pour démontrer définitivement le rôle des cellules satellites dans la croissance hyperplasique chez les poissons.

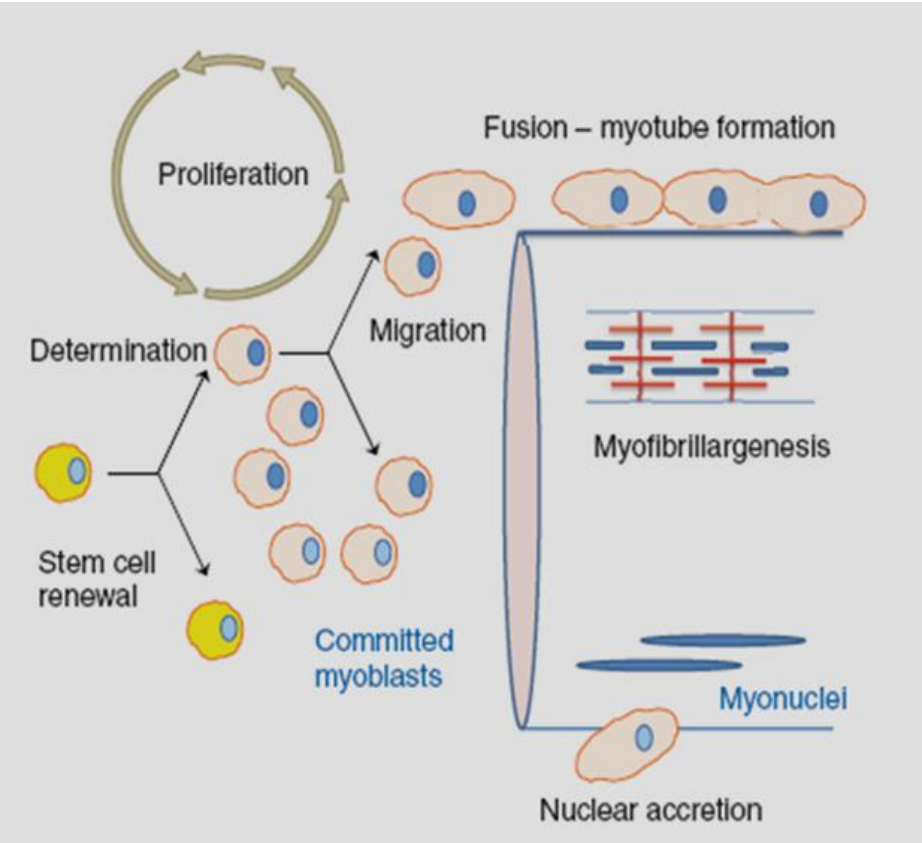

Figure 9 : Croissance musculaire post-embryonnaire chez les poissons téléostéens. Les précurseurs myogéniques vont s'activer, proliférer (myoblastes) et se différencier. Ensuite, ils peuvent soit fusionner entre eux pour former des myotubes puis des fibres (hyperplasie), soit fusionner avec une fibre existante et participer à sa croissance en taille (hypertrophie)(Johnston et al., 2011).

1.3.6. Rôles des cellules satellites dans le processus de régénération

Le muscle squelettique a la capacité de se régénérer, en formant de nouvelles fibres à l'aide des cellules satellites. La régénération du muscle squelettique se fait en 3 phases : 1) la réponse inflammatoire ; 2) l'activation, la différenciation et la fusion des précurseurs myogéniques ; et, 3) la maturation et le remodelage des myofibres nouvellement formées (Yin *et al*., 2013).

A la suite d'une lésion, la dégénérescence du muscle commence par la nécrose des fibres musculaires lésées. La perte d'intégrité membranaire de la fibre lésée conduit à la dissolution du sarcolemme. La nécrose cellulaire est connue pour activer les cascades complémentaires induisant une réponse inflammatoire (Orimo *et al*., 1991). Au niveau du site lésionnel, on observe ensuite l'infiltration des neutrophiles et macrophages. Plusieurs études ont montré que les facteurs sécrétés des macrophages facilitent la prolifération et la différenciation des précurseurs myogéniques (Lescaudron *et al*., 1999; Merly *et al*., 1999; Cantini *et al*., 2002). En outre, la lésion peut être simulée par ajout dans le milieu de culture de TNFα et d'IL1-β afin de suivre les capacités myogéniques d'une population cellulaire considérée (Karalaki *et al*., 2009a; Kamizaki *et al*., 2017a). Une forte prolifération cellulaire peut se produire au niveau du site lésionnel. Le blocage de cette prolifération cellulaire, par la colchicine (Pietsch, 1961), réduit considérablement les capacités régénératives du muscle. Chez les mammifères, les cellules satellites sont essentielles à la régénération musculaire, puisque leur suppression induit des défauts de régénération (Seale *et al*., 2000; Oustanina *et al*., 2004; Kuang *et al*., 2006). Le muscle de la truite adulte est, lui aussi, capable de régénération. En effet, 30 jours après une lésion on observe la formation de nouvelles fibres au niveau du site lésionnel (Montfort *et al*., 2016). D'ailleurs, cette étude a montré des signatures transcriptomiques partagées entre le muscle en régénération et le myotome hyperplasique post-embryonnaire (Montfort *et al*., 2016). Plus particulièrement, l'expression des facteurs de régulation myogénique (*myod*, *myf5*, *myogénine* et *mrf4*) est augmentée, à la fois dans les zones de néo-myogenèse post-embryonnaire, et dans le tissu en régénération comparé au tissu adulte (Rescan *et al*., 2013; Montfort *et al*., 2016). Ces résultats suggèrent l'implication des précurseurs myogéniques dans ces deux processus chez la truite (Montfort *et al*., 2016). Récemment, l'activation, la prolifération, la migration et la fusion des précurseurs myogéniques permettant la régénération des fibres musculaires *in situ* ont été suivi chez le

poisson zèbre (Gurevich *et al*., 2016). Ces fibres nouvellement formées présentent un diamètre plus petit et des noyaux centraux. A la fin du processus de régénération, la taille des fibres régénérées est équivalente à celles qui n'ont pas été lésées et les myonuclei ont retrouvé leur position caractéristique en périphérie, contre la membrane sarcoplasmique. Les précurseurs myogéniques retournent, ensuite, à l'état de quiescence. Le tissu musculaire présente, ainsi, une capacité complète de régénération caractérisée par une restauration morphologique et fonctionnelle extrêmement performante.

1.3.7. Mécanismes moléculaires impliqués dans l'activation ou la quiescence des cellules satellites

Chez les mammifères adultes, les cellules satellites sont en quiescence. Elles sont caractérisées par une faible activité métabolique et sont dans un état réversible de sortie du cycle cellulaire. En réponse à une lésion, elles sont activées. Elles ré-entrent, alors, dans le cycle cellulaire et se différencient. Tandis que les cellules activées se différencient, une fraction de la population reste en prolifération et retourne à l'état de quiescence en vue d'assurer le maintien du pool des cellules souches musculaires (Relaix and Zammit, 2012).

Les états d'activation ou de quiescence des précurseurs myogéniques sont régulés via l'expression de gènes, de miARN et de régulations épigénétiques. De plus, le dialogue croisé complexe entre la cellule satellite et le microenvironnement influe sur l'état d'activation ou de quiescence via l'ensemble de ces voies moléculaires.

1.3.7.1. Gènes régulateurs de la prolifération et de la différenciation des cellules satellites

Le facteur de transcription Pax7 est un régulateur déterminant de la survie, de la spécification et de l'auto renouvellement des cellules satellites (Seale *et al*., 2000).

Les cellules satellites en quiescence expriment fortement Pax7 (Rocheteau *et al*., 2012), tandis que les facteurs de régulation myogénique comme Myf5 et MyoD ne s'expriment pas. Dans les cellules en auto renouvellement, l'expression de Pax7 subsiste à un plus faible niveau

et, diminue pendant la différenciation myogénique (Relaix and Zammit, 2012; Rocheteau *et al*., 2012). L'expression de Pax7 inhibe la différenciation myogénique et la progression des cellules dans le cycle cellulaire permettant un état de quiescence (Olguin and Olwin, 2004).

Les mécanismes moléculaires régissant la capacité des cellules souches adultes à sortir du cycle cellulaire vers un état de quiescence restent peu connus. Pourtant, l'état de quiescence est primordial à la préservation des fonctions des cellules souches. Une équipe a récemment démontrée la présence de deux phases fonctionnellement différentes dans l'état de quiescence des cellules satellites, une phase G_0 et une phase G_{Alerte} (Rodgers *et al*., 2014). Les cellules satellites peuvent effectuer la transition réversible entre ces phases en réponse aux signaux systémiques relargués lors d'une lésion. L'activation de mTORC1 est nécessaire et suffisante à la transition d'un état G_0 vers un état G_{Alerte} . Ce signal est médié par le récepteur HGF cMet. Il est supposé que la transition vers l'état G_{Alerte} permettrait une réponse plus rapide des cellules satellites au besoin de régénération (Rodgers *et al*., 2014).

En outre, une étude élégamment menée présente l'association de l'état de quiescence à la répression globale de la traduction protéique. Cette répression de la synthèse des protéines au sein des cellules est réalisée par eIF2α, facteur d'initiation de la traduction, lorsque qu'il est phosphorylé en S51. Cette phosphorylation est médiée par une kinase du réticulum endoplasmique (Perk). L'expression conditionnelle de ces protéines, dans les cellules satellites en état de quiescence ou d'activation, a montré que cette voie, par la répression de la traduction, induit le maintien ou la mise en quiescence des cellules. En outre, l'inhibition de l'une ou l'autre de ces protéines induit, non seulement l'activation des précurseurs myogéniques vers la différenciation, mais cette inhibition empêche, de plus, les cellules de s'auto-renouveler *in-vitro* et *in-vivo* conduisant à l'appauvrissement du pool des cellules satellites (Zismanov *et al*., 2016). La voie JAK-STAT est également une voie de signalisation majeure impliquée dans la quiescence et l'auto-renouvèlement des précurseurs myogéniques. En effet, l'injection intramusculaire d'inhibiteurs pharmacologique de Jak2 et Stat3 stimule la prolifération des précurseurs myogéniques et entraîne une amélioration marquée de la réparation musculaire (Price *et al*., 2014). Tandis que, le knock-out de Stat3, dans les précurseurs myogéniques, induit des défauts de prolifération des précurseurs myogéniques conduisant à des défauts de régénération (Zhu *et al*., 2016). Même si

l'implication précise de la voie de signalisation JAK-STAT reste à préciser, il semble qu'elle soit un acteur majeur dans l'état de quiescence et le maintien du pool satellitaire.

Par opposition aux cellules satellites quiescentes, les précurseurs myogéniques activés sont caractérisés par une forte expression des facteurs de transcription, tels que MyoD (Cooper *et al*., 1999; Cornelison *et al*., 2000) et Myf5 (Cornelison and Wold, 1997). A la suite d'une lésion musculaire, des cellules exprimant MyoD, Desmine et Myogénine se trouvent au niveau du site lésionnel. Selon la prédominance de l'expression de MyoD ou de Myf5, il semble que les myoblastes n'expriment pas le même programme de différenciation myogénique (Rudnicki *et al*., 2008). Ainsi, la prédominance d'expression de MyoD engendre une différenciation rapide (Montarras *et al*., 2005), tandis que celle de Myf5 privilégie le programme de prolifération et retarde celui de différenciation (Sabourin and Rudnicki, 2001). De plus, MyoD et Myf5 ont différents profils d'expression au cours du cycle cellulaire. MyoD s'exprime en G_1, alors que Myf5 présente un pic d'expression en phase G_0 et G_2 (Kitzmann *et al*., 1998). Une étude récente présente un schéma dynamique de l'expression de Myf5 et MyoD et de leurs rôles distincts et complémentaires, dans l'engagement des précurseurs myogénique et le programme de différenciation (Conerly *et al*., 2016).

Immédiatement après l'engagement des cellules vers la voie de différenciation myogénique, la voie p38α/βMAPK est activée (Jones *et al*., 2015). L'activation de cette voie s'effectue de manière asymétrique pendant la division cellulaire, permettant ainsi à l'une des cellules filles de réaliser l'auto renouvellement et un retour à l'état de quiescence (Troy *et al*., 2012). L'une des actions de la voie p38α/βMAPK est la phosphorylation de MAPKAP2 qui inhibe, à son tour, la Tristretraproline (TTP). Or, la TTP est un régulateur post transcriptionnel de MyoD, agissant comme un régulateur de quiescence des cellules satellites. En effet, la TTP se fixe en région 3'UTR de l'ARN messager de MyoD et induit sa dégradation (Hausburg *et al*., 2015).

TRAF6 est une protéine effectrice des signaux induit par l'activation des récepteurs au TNF, à l'interleukine 1 et au TLR (Chung *et al*., 2007). TRAF6 est fortement exprimée dans les précurseurs myogéniques en culture, mais son niveau d'expression diminue avec la différenciation. *In vivo*, TRAF6 est exprimée dès les stades précoces du développement musculaire et son niveau d'expression baisse graduellement durant la myogenèse (Paul *et al*., 2010). Une étude a révélé que TRAF6 est un élément essentiel de la voie de régulation de

l'expression de Pax7. En effet, TRAF6 régule négativement la voie p38 MAPK, connue pour jouer un rôle dans la différenciation myogénique (Bernet *et al*., 2014; Jones *et al*., 2015). Les cellules satellites en quiescence, traitées avec des inhibiteurs de la p38 MAPK, échouent à entrer dans le cycle cellulaire. A l'inverse, la sur-activation de la voie p38 MAPK induit une sortie de l'état de quiescence des précurseurs myogéniques (Troy *et al*., 2012; Jones *et al*., 2015). L'expression de p38 MAPK entraîne une diminution de la phosphorylation de ERK 1/2 jouant un rôle dans l'auto renouvellement des précurseurs myogéniques (Abou-Khalil *et al*., 2009). De plus, JNK 1/2 présente un niveau de phosphorylation augmenté lorsque TRAF6 est réprimé. Or l'inhibition de JNK 1/2 réprime l'expression de Pax7. TRAF6 semble ainsi jouer un rôle clé dans le maintien de la quiescence et l'auto renouvellement lors de l'activation des précurseurs myogéniques par la modulation de l'expression de Pax7 (Hindi and Kumar, 2016).

Un autre facteur important dans l'homéostasie et les capacités régénératives des cellules satellites est TAK1. Son inactivation induit une différenciation précoce des précurseurs myogéniques et une augmentation du stress oxydatif conduisant à une mort cellulaire prématurée. De plus, TAK1 permet l'activation de la voie NF-kB et JNK dans les précurseurs myogéniques. Ainsi, on constate que TAK1 est essentielle à l'auto-renouvèlement et à la prolifération des cellules satellites par son rôle dans le maintien du pool satellitaire (Ogura *et al*., 2015).

D'une manière générale, l'augmentation de l'activité mitochondriale a été associée à la sortie de la quiescence, avec d'une part la réentrée dans le cycle cellulaire des précurseurs myogéniques, et d'autre part à la myogenèse (Rocheteau *et al*., 2012; Wagatsuma and Sakuma, 2013; Rodgers *et al*., 2014). Le métabolisme protéique élevé est également associé à l'état activé des précurseurs myogéniques (Pietrosemoli *et al*., 2017). Par ailleurs, des études hauts débits ont été réalisées, afin de caractériser les profils d'expressions géniques dans les états de quiescence *versus* activation (Fukada *et al*., 2007; Pallafacchina *et al*., 2010). L'ensemble de ces travaux apportent une vision d'ensemble (schématisée figure 10), des différents états observés des précurseurs myogéniques et des régulations géniques associées chez les mammifères.

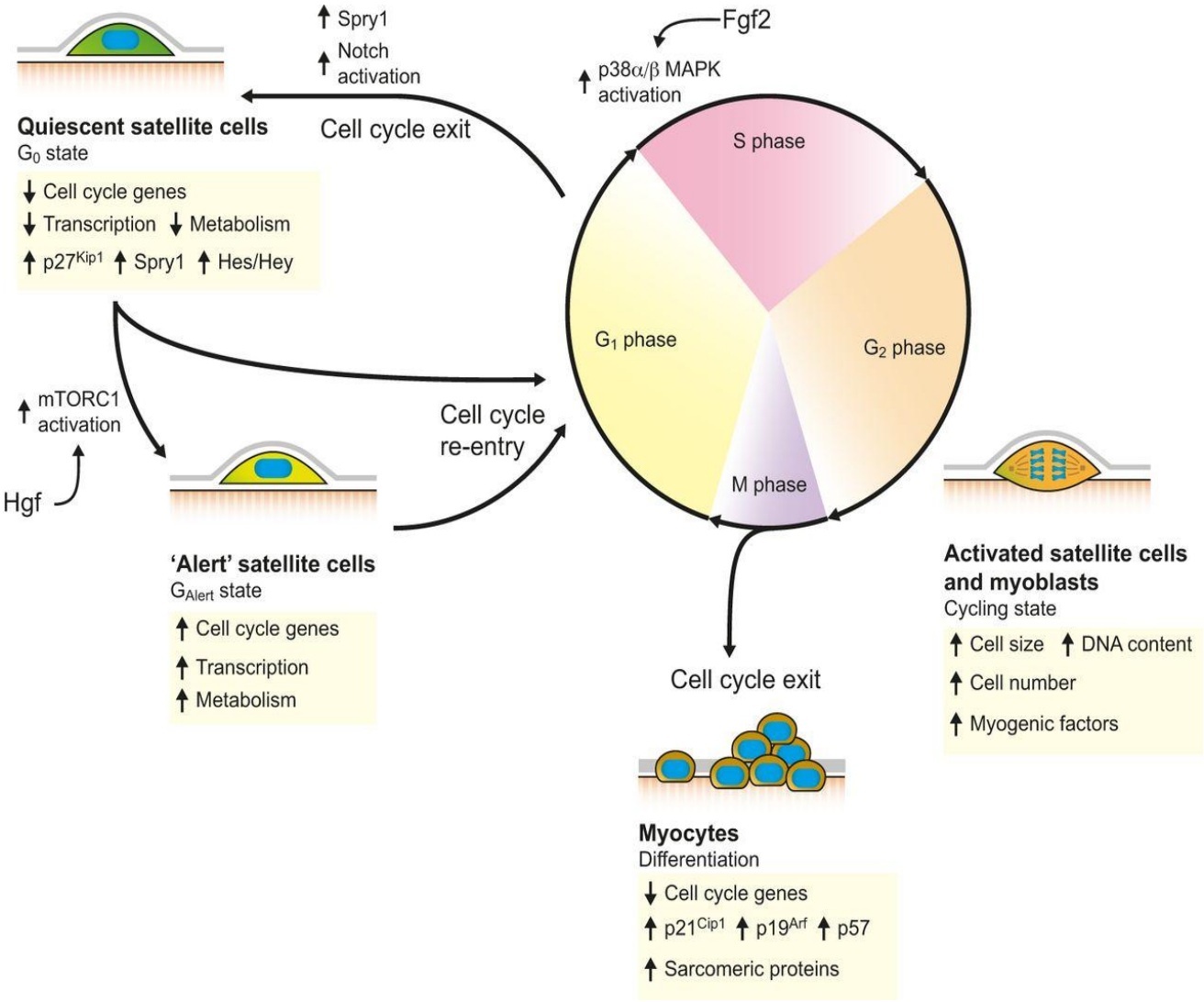

Figure 10 : Régulation du cycle cellulaire dans les cellules satellites. Dans le tissu sain, les cellules satellites sont maintenues dans un état G0 de quiescence réversible. Les cellules satellites activées rentrent ensuite dans le cycle cellulaire, soit directement, soit par un état intermédiaire appelé GAlert. Après l'activation, les cellules satellites peuvent quitter le cycle cellulaire et revenir à la quiescence en surexprimant Spry1 ou en activant la voie de signalisation Notch. Les myoblastes en prolifération quittent également le cycle cellulaire pour se différencier en myocytes et progresser dans la lignée myogénique (Dumont et al, 2015a).

1.3.7.2. MiARN impliqués dans la myogenèse

La régulation de l'expression génique est également réalisée au niveau post-transcriptionnel par les micro-ARN (miARN). D'une longueur d'environ 22 nucléotides, ces petits ARN ciblent l'ARN messager. Ils forment une unité d'ARN double brin par liaison des séquences nucléotidiques complémentaires, reconnue par le complexe protéique RISC. Ce dernier

permet soit i) la dégradation des ARN double brin et donc la diminution des transcrits cibles (Lee *et al*., 1993; Wightman *et al*., 1994), soit ii) l'inhibition de la traduction (MacFarlane and Murphy, 2010).

Appelés myomiR, plusieurs miARN ont été décrits comme jouant des rôles prédominants dans la formation et la régénération du muscle squelettique.

En effet, de concert à l'augmentation de l'expression de MyoD durant l'activation des précurseurs musculaires, il a été observé une augmentation de l'expression de miR-1 et miR-206. Or, la région 3'UTR du transcrit de Pax3, impliqué dans l'activation des précurseurs myogéniques, est la cible de miR-1 et miR-206. Cette baisse de la traduction de Pax3 est également médiée par miR-27b. En effet, certains transcrits Pax3 présentent une polyadénylation alternative et une région 3' UTR plus courte, contenant le site complémentaire du miR-27b mais dépourvues des sites complémentaires pour les miR-1 et miR-206 (Crist *et al*., 2009). miR-206 et miR-486 ciblent la région 3' UTR du transcript de Pax7. Leur expression est augmentée durant la différenciation des myoblastes. Par ailleurs, l'inhibition de ces miARN ralentit le processus de différenciation *in vitro* et permet une persistance de la traduction de Pax7, alors que leur surexpression accélère le processus de différenciation myogénique. De plus, leur administration *in vitro* sur les cellules C2C12 a révélé une augmentation de la durée de la phase G1 et une diminution de la phase S, suggérant une action positive sur la prolifération des myoblastes (Dey *et al*., 2011). Due à la répression de Pax7, les inhibiteurs de la différenciation comme ID1-2 et ID1-3 sont également réprimés. Les protéines ID ont une structure tertiaire en HLH avec une perte de la région basique. Elles forment des hétérodimères inactifs avec les facteurs de transcriptions, tels que E12, E47 et MyoD. De plus, MyoD est un facteur de transcription pour miR-206 et miR-486, formant une boucle d'autorégulation positive et permettant le maintien des cellules dans un processus de différenciation (Dey *et al*., 2011). Ces résultats mettent en lumière la nécessité et l'importance des actions synergiques entre les miARN et les facteurs de transcription dans l'initiation du programme de différenciation.

Une étude sur les C_2C_{12} a révélé que miR-133 réprime l'expression du FGFR1 et de PP2AC ce qui induit une répression de la voie ERK1/2. miR-133 semble ainsi inhiber la prolifération par la répression de la voie ERK1/2 pour faciliter la différenciation myogénique (Feng *et al*., 2013).

L'inactivation de miR-1 et miR-133 chez le poisson zèbre, à l'aide de morpholinos, induit une désorganisation de l'actine sarcomérique (Mishima *et al*., 2009).

Un autre miARN intervenant dans le processus de différenciation myogénique est le miR-214. Il a été démontré que miR-214 joue un rôle dans le développement du muscle lent chez le poisson zèbre (Flynt *et al*., 2007). En effet, miR-214 cible le proto-oncogène N-Ras impliqué dans la croissance cellulaire (Liu *et al*., 2010). De plus, miR-214 cible directement Ezh2 (Juan *et al*., 2009), qui se fixe sur le promoteur MyoD dans les cellules souches embryonnaires ainsi que plusieurs de ses gènes cibles dans les myoblastes en prolifération. Cette liaison permet la répression de la transcription par le remodelage de la chromatine (cf chapitre sur les régulations épigénétiques). Cette dernière étude a également identifié que MyoD et Myogénine, en qualité de facteur de transcription, contrôlent la transcription du miR-214 formant une boucle de rétrocontrôle positif.

Certains miARN ont également été identifiés comme prépondérants dans le maintien ou la mise en quiescence des précurseurs myogéniques. Ainsi, miR-489, fortement exprimé dans les cellules satellites en quiescence, voit son expression décroître durant l'activation des précurseurs myogéniques. Le miR-489 a pour fonction de réguler l'état de quiescence via la suppression de l'expression de l'oncogène Dek (Cheung *et al*., 2012). La baisse de l'expression de miR-489 permet l'expression de Dek participant à l'auto-renouvèlement.

1.3.7.3. Rôle des régulations épigénétiques

Dans les cellules eucaryotes, le génome est compacté dans la chromatine, une chaîne de nucléosomes composés de quatre histones H2A, H2B, H3, H4. Leur extrémité amino-terminale est exposée à la surface du nucléosome et est sujette à de multiples modifications post-traductionnelles (Kouzarides, 2007). L'activation et la répression de l'initiation de la transcription sont régulées par ces modifications. A ce jour, trois types de tri-méthylations de l'histone 3 ont été observés. Parmi celles-ci, deux sont médiées par les méthyl transférases de la famille trithorax (TrxG). Il s'agit des tri-méthylations des lysines 4 (H3K4me3) et 36 (H3K36me3), qui sont associées à une activation de la transcription. Tandis que, la tri-méthylation de l'histone 3 en lysine 27 (H3K27me3), médiée par les méthyl transférases du groupe Polycombe (PcG), est associée à la répression de la transcription. Cette répression par

la H3K27me3 est transmise à la cellule fille lors de la division cellulaire et aura une action dominante par rapport à la H3K4me3. L'activation de la transcription des gènes associés requier l'action des déméthylases 6A et 6B (Kdm6a et Kdm6b).

L'acétylation des résidus lysines des histones neutralise leur charge globale positive ce qui facilite l'ouverture de la chromatine et favorise l'accessibilité des gènes aux facteurs de transcription. Inversement, la dés-acétylation des histones induit une répression de la transcription via la compaction de la chromatine. L'action combinée de deux familles d'enzymes, les histones acétyle transférases (HAT) et les dés-acétylases (HDAC), détermine le niveau d'acétylation des histones du génome.

Au niveau de la chromatine, l'état de quiescence des cellules satellites est caractérisé par une baisse générale de la marque répressive H3K27me3 et par une présence concomitante de l'H3K27me3 et de la H3K4me3, au niveau des sites d'initiation de la transcription d'environ 50% des gènes annotés (Liu *et al*., 2013). Ces gènes se trouvent non transcrits ou transcrits à un niveau très faible. De plus, il est important de souligner que ces domaines bivalents (présence concomitante de la H3K27me3 et H3K4me3) sont souvent associés à des gènes du développement, suggérant leur rôle dans l'état peu différencié des cellules satellites en quiescence (Bigot *et al*., 2015). En outre, Boonsanay *et al*., (2016) ont montré que le maintien des cellules satellites en quiescence est également réalisé par l'histone méthyl transférase Suv4-20H1, qui permet le maintien de l'hétérochromatine et la répression de la transcription de MyoD. L'auto-renouvèlement des cellules satellites est une propriété qui peut également être modulée via des régulations épigénétiques (Boonsanay *et al*., 2016).

Une étude a mis en évidence que, pendant l'activation des précurseurs myogéniques, il y a une réduction du NAD+ disponible dans le cytosol, entrainant une réduction de l'activité de SIRT1. Une élévation de l'acétylation des H4K16 et l'augmentation de l'expression des gènes codant MyoD et MyoG (Ryall *et al*., 2015) est induite. Ainsi, les conditions métaboliques de la cellule satellite peuvent influer sur les régulations épigénétiques permettant l'engagement des cellules dans le programme de différenciation.

1.3.7.4. Influence du microenvironnement sur les précurseurs myogéniques

La notion de niche, comme microenvironnement spécifique des cellules souches *in vivo*, fut évoquée pour la première fois lors d'études menées chez la drosophile (Xie and Spradling, 2000). Il est largement admis aujourd'hui que ce microenvironnement joue un rôle essentiel dans le maintien de la quiescence et de l'activité de la cellule souche adulte (Voog and Jones, 2010). Dans le cas de la cellule satellite musculaire, la position satellitaire de la cellule, entre la lame basale et la myofibre, constitue sa niche (Collins *et al*., 2005). Pourtant, les mécanismes cellulaires et moléculaires, régissant l'occupation de la niche par les cellules souches, et plus particulièrement les cellules satellites, restent peu connus. La voie Notch, récemment décrite, est une voie de signalisation juxtacrine, nécessaire à l'adressage des cellules dans leur position satellitaire (Brohl *et al*., 2012). La niche joue également un rôle crucial dans le contrôle des apports en nutriments et en oxygène aux cellules souches. Il a été démontré, de façon surprenante, que l'abaissement des teneurs en oxygène permettait de préserver la pluripotence des cellules souches (Latil *et al*., 2012). D'une manière générale, le défaut d'adressage des cellules satellites à leur niche entrainera des défauts dans la croissance et la régénération musculaire, soulignant l'importance des effets paracrines de la niche environnante sur les propriétés intrinsèques des cellules souches.

Objectifs et Stratégies

Comme nous l'avons vu dans l'introduction bibliographique, la persistance de la croissance hyperplasique, après le stade juvénile, a été rapportée chez des poissons de grande taille comme la dorade (Rowlerson *et al*., 1995), la carpe (Koumans *et al*., 1993a), le bar européen (Veggetti *et al*., 1990) et la truite arc-en-ciel (Stickland, 1983; Rescan *et al*., 2015). L'hyperplasie musculaire nécessite des cellules souches musculaires, aussi appelées cellules satellites, localisées entre la myofibre et la lame basale. Dans le muscle de mammifères adultes, les cellules satellites sont quiescentes, mais, suite à une lésion, peuvent s'activer et entrer dans le programme de différenciation myogénique. Chez les poissons, on ignore en grande partie si les précurseurs myogéniques des muscles hyperplasiques des poissons présentent un état physiologique spécifique qui expliquerait cette persistance de l'hyperplasie post-larvaire.

L'objectif de la thèse est de déterminer quelles sont les caractéristiques cellulaires et moléculaires des précurseurs myogéniques du muscle hyperplasique de la truite.

Pour cela nous avons comparé des précurseurs myogéniques issus de muscle hyperplasique et non-hyperplasique en réalisant des analyses histologiques et transcriptomiques (ARNm et miARN). Nous avons également comparé le comportement *in vitro* de ces précurseurs myogéniques de truite. Les précurseurs myogéniques issus de muscles hyperplasiques, ont été obtenus à partir de truitelles de 5g (Juvenile trout : JT), la croissance musculaire hyperplasique, à ce stade, étant prépondérante (Mommsen, 2001). Les précurseurs myogéniques de muscles non-hyperplasiques ont été obtenus à partir de truitelles de 5 g à jeun (Fasting Juvenile trout : FJT) et de truites adultes (Adult trout : AT). En effet, il a été montré que le jeûne arrête la croissance musculaire et la myogenèse (Gabillard *et al*., 2006) et que la production de nouvelles fibres musculaires cesse vers 18 mois lorsque les truites sont matures (Rescan *et al*., 2015).

Dans le premier chapitre, nous avons en premier lieu, comparé la prolifération *in situ* des précurseurs myogéniques du muscle hyperplasique et non hyperplasique. En second lieu, nous avons confronté les profils d'expressions géniques des précurseurs myogéniques du muscle hyperplasique de la truite juvénile en croissance (JT) et du muscle non hyperplasique de la truite juvénile à jeun (FJT) et de la truite adulte (AT). Puis, nous avons relié ces observations aux capacités de prolifération et de différenciation *in vitro* de ces précurseurs.

Dans le second chapitre, compte tenu des conditions physiologiques très différentes qui conduisent à l'arrêt de l'hyperplasie chez la truite juvénile à jeun (FJT) et la truite adulte (AT), nous avons réalisé une comparaison fine des transcriptomes de leurs précurseurs myogéniques.

Afin de préciser les observations précédemment recueillies, nous nous sommes intéressés aux réseaux de régulations post-transcriptionnels associés aux précurseurs myogéniques du muscle hyperplasique. Le troisième chapitre est dédié à la caractérisation des profils d'expression des miARN des précurseurs myogéniques du muscle hyperplasique de la truite juvénile en croissance (JT) et du muscle non hyperplasique de la truite juvénile à jeun (FJT) et de la truite adulte (AT). Enfin, une méta-analyse des données du transcriptome (chapitre 1) et du miRnome a été réalisée, en vue d'identifier de nouveaux couples potentiels miARN-ARNm associés à un état spécifique, quiescent ou activé, des précurseurs myogéniques de la truite.

Chapitre 1 : Les analyses histologiques, transcriptomiques et *in vitro* révèlent que les précurseurs myogéniques du muscle hyperplasique de la truite sont activés

Résumé de l'article

Après l'éclosion, la croissance musculaire chez les poissons s'effectue par hyperplasie et hypertrophie des fibres. La croissance hyperplasique correspond à la production de nouvelles fibres musculaires dans tout le myotome. Une persistance de la croissance hyperplasique, après le stade juvénile, a été rapportée chez des poissons de grande taille finale, tels que la dorade (Rowlerson *et al*., 1995), la carpe (Koumans *et al*., 1993a), le bar européen (Veggetti *et al*., 1990) et la truite arc-en-ciel (Stickland, 1983; Rescan *et al*., 2015). C'est un processus de croissance extrêmement développé chez les poissons à croissance continue. En effet, le nombre de fibres est multiplié par 150 environ entre une truite à l'éclosion et une truite de 60 cm de longueur (Stickland, 1983). En comparaison, le nombre de fibres est multiplié par 10 chez le poisson zèbre entre l'éclosion et le poids adulte (Stickland, 1983; Johnston *et al*., 2009). L'hyperplasie musculaire nécessite des cellules souches musculaires, aussi appelées cellules satellites (Mauro, 1961) qui sont localisées entre la myofibre et la lame basale. Une fois activés pendant le développement, la croissance ou après une lésion musculaire, les précurseurs myogéniques prolifèrent et se différencient pour former de nouvelles myofibres (Miller *et al*., 1998; Dumont *et al.*, 2015a). Des cellules satellites ont été clairement identifiées *in situ* dans le muscle de la carpe (Koumans and Akster, 1995) et du poisson zèbre (Gurevich *et al*., 2016). *In vitro*, les précurseurs myogéniques extraits du muscle de la truite et de la carpe prolifèrent et fusionnent pour former des myotubes (Koumans *et al*., 1993b; Fauconneau and Paboeuf, 2000; Gabillard *et al*., 2010).

Notre objectif était donc de caractériser les mécanismes cellulaires et moléculaires des précurseurs myogéniques pendant la croissance hyperplasique. A cet effet, nous avons examiné la prolifération *in situ*, le comportement *in vitro* et le transcriptome de précurseurs myogéniques provenant de muscle hyperplasique et non-hyperplasique. Les précurseurs myogéniques extraits de muscles hyperplasiques ont été obtenus à partir de truitelles de 5g (Juvenile trout : JT) puisque à ce stade la croissance musculaire hyperplasique est prépondérante (Mommsen, 2001). Les précurseurs myogéniques de muscles non-hyperplasiques ont été obtenus à partir de truitelles de 5 g à jeun (Fasting Juvenile trout : FJT) et de truites adultes (Adult trout : AT) (Gabillard *et al*., 2006; Rescan *et al*., 2015b).

Nos travaux montrent, pour la première fois, une prolifération des précurseurs myogéniques dans le muscle hyperplasique de la truite. Cette prolifération des cellules, en position satellitaire, diminue avec l'âge et est complètement inhibée par le jeûne. Les précurseurs myogéniques FJT et AT présentent un transcriptome très proche avec seulement 64 gènes différentiellement exprimés. Ceci contraste avec les 2623 gènes différentiellement exprimés entre les JT et les deux conditions d'arrêt de croissance (FJT et AT). Parmi les gènes surexprimés chez les JT, on constate un enrichissement de gènes impliqués dans le métabolisme protéique, le métabolisme cellulaire, la prolifération et la différenciation myogénique. En outre, nous avons observé, parmi les gènes sous-exprimés, un enrichissement de gènes impliqués dans la voie Notch, qui indiquent une répression des marqueurs de quiescence. En cohérence avec les signatures transcriptomiques relevées, nous avons également montré que les précurseurs myogéniques JT présentaient de plus grandes capacités de prolifération et de différenciation *in vitro,* comparés aux AT et FJT.

En conclusion, les analyses transcriptomiques, *in vitro* et *in vivo,* convergent et étayent l'idée selon laquelle, les précurseurs myogéniques, extraits de muscle en croissance hyperplasique, présentent de plus grandes capacités intrinsèques à former des myofibres comparés aux précurseurs myogéniques, extraits de muscle de truites adultes ou juvéniles soumises à un jeûne. Les profils d'expressions géniques, dans les précurseurs myogéniques de truites juvéniles, permettent de mieux comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires qui contrôlent l'hyperplasie et, ainsi, d'obtenir une liste de marqueurs potentiels de la croissance musculaire, dans sa composante hyperplasique, chez les poissons.

Histological, transcriptomic and *in vitro* analysis reveal an intrinsic activated state of myogenic precursors in hyperplasic muscle of trout

Sabrina Jagot, Nathalie Sabin, Aurélie Le Cam, Jérôme Bugeon, Pierre-Yves Rescan, Jean-Charles Gabillard*

INRA, LPGP, Fish Physiology and Genomic Laboratory, 35000 Rennes, France

Corresponding author : Jean-Charles.gabillard@inra.fr

Keywords : fish; myoblast; proliferation; differentiation; hyperplasia; muscle stem cell;

Abstract

Background

The dramatic increase in myotomal muscle mass in post-hatching fish is related to their ability to lastingly produce new muscle fibres, a process termed hyperplasia. The molecular and cellular mechanisms underlying fish muscle hyperplasia largely remain unknown. In this study, we aimed to characterize intrinsic properties of myogenic cells originating from fish hyperplasic muscle. For this purpose, we compared in situ proliferation, *in vitro* cell behavior and transcriptomic profile of myogenic precursors originating from hyperplasic muscle of juvenile trout (JT) and from non-hyperplasic muscle of fasted juvenile trout (FJT) and adult trout (AT).

Results

For the first time, we showed that myogenic precursors proliferate in hyperplasic muscle from JT as shown by *in vivo* BrdU labeling. This proliferative rate was very low in AT and FJT muscle. Transcriptiomic analysis revealed that myogenic cells from FJT and AT displayed close expression profiles with only 64 differentially expressed genes (BH corrected p-val < 0.001). In contrast, 2623 differentially expressed genes were found between myogenic cells from JT and from both FJT and AT. Functional categories related to translation, mitochondrial activity, cell cycle, and myogenic differentiation were inferred from genes up regulated in JT compared to AT and FJT myogenic cells. Conversely, Notch signaling pathway, that signs cell quiescence, was inferred from genes down regulated in JT compared to FJT and AT. In line with our transcriptomic data, *in vitro* JT myogenic precursors displayed higher proliferation and differentiation capacities than FJT and AT myogenic precursors.

Conclusions

The transcriptomic analysis and examination of cell behavior converge to support the view that myogenic cells extracted from hyperplastic muscle of juvenile trout are intrinsically more potent to form myofibres than myogenic cells extracted from non-hyperplasic muscle. The generation of gene expression profiles in myogenic cell extracted from muscle of juvenile

trout may yield insights into the molecular and cellular mechanisms controlling hyperplasia and provides a useful list of potential molecular markers of hyperplasia.

Background

Many fish teleosts have the extraordinary ability to growth throughout their life, and to continuously produce new muscle fibres (hyperplasia). The persistence of hyperplasic growth after juvenile stage was reported in large final size fish such as gilthead bream [1], carp [2], european sea bass [3] and rainbow trout [4, 5] and was found in a lesser extent in the small sized zebrafish [6]. Nevertheless, production of new muscle fibers in fish myotome decreases with age and eventually stops [7]. Such as muscle fibre input dynamics was notably observed in trout [4, 5]. Furthermore, it is well known that fasting stops growth [8] and an inhibition of *in vitro* proliferation of myogenic precursors in fasted rainbow trout has been observed [9].

Muscle hyperplasia requires muscle stem cells, also called satellite cells [10] which are localized between myofibre and basal lamina. Once activated during development, growth or after muscle injury, myogenic precursors proliferate and differentiate to eventually form nascent myofibres [11, 12]. Myogenic differentiation is associated with the expression of the myogenic regulatory factor MyoD [13]. Then, the expression of myogenin at the onset of the satellite cell differentiation triggers the expression of fusogenic and structural protein such as myomaker and myosin heavy chain [14, 15]. Satellite cells have been clearly identified *in situ* in muscle of carp [16] and zebrafish [17]. *In vitro*, myogenic precursors extracted from salmon, trout, sea bream, zebrafish, pacu, turbot and carp muscle proliferate and fuse into myotube [6, 9, 18–23]. Whether myogenic progenitors in fish hyperplasic muscle exhibit specific intrinsic physiological state predisposing them to produce new myofibres is unknown. To test this hypothesis, and investigate the biological processes involved, we extracted these cells from hyperplasic muscle of juveniles growing trout (JT), and non-hyperplasic muscle of fasted juvenile trout (FJT) and adult trout (AT), and compared their ability to proliferate *in situ*, as well as their transcriptome and their proliferation and differentiation capacities in culture.

The use of two non-hyperplasic muscle conditions allowed us to discard differentially expressed genes related to nutritional status, age, etc., and thus to focus on differentially expressed genes specific to non-hyperplasic muscle. Our results converge to support the view

that myogenic cells extracted from hyperplasic muscle of juvenile trout are intrinsically more potent than myogenic cells extracted from non-hyperplasic muscle.

Results

Myogenic precursors proliferate in hyperplasic muscle during post-larval growth

In order to quantify the number of proliferative satellite cells in trout of 2g, 500g and fasted trout of 5g, we developed immunofluorescence analysis to locate proliferative nuclei in satellite cell position, i.e. located under the basal lamina. For this purpose, we injected fish with BrdU and performed immunofluorescence analysis with an antibody against BrdU and laminin a major component of basal lamina. As shown in figure 1, the percentage of BrdU positive nuclei in juvenile trout was 7.2%, whereas this proportion dropped to 1.3% in larger trout (500g) and 0,1% in 3-week fasted juvenile trout.

Myogenic precursors extracted from hyperplasic and non-hyperplasic trout muscles exhibit distinct transcriptome

To better known the intrinsic molecular properties of myogenic precursors from hyperplasic muscle, we compared the transcriptome of myogenic precursors extracted from juvenile trout (JT) displaying hyperplasic muscle growth with that of myogenic precursors extracted from non-hyperplasic muscle resulting from fasted juvenile trout (FJT) and adult trout (AT). For this purpose, we first compared gene expression profiles between myogenic precursors from FJT and AT in order to identify genes whose differential expression would be specifically related to age or fasting. LIMMA statistical test [24] (BH corrected p-val < 0.001) showed that only 64 genes were differentially expressed between FJT and AT samples. These differentially expressed genes (DEGs) were subsequently discarded for further analysis. Using two LIMMA statistical tests (BH corrected p-val < 0.001) a total of 3992 DEGs were identified between JT and FJT and 4253 DEGs between JT and AT. Then, we retained common genes found in this two differential analysis and found a total of 2623 differentially expressed genes between hyperplasic (JT) and non-hyperplasic muscle (FJT and AT). These differentially expressed genes

were then hierarchically clustered. The unsupervised clustering, which is shown in figure 2 (available as supplemental data file 1), resulted in the formation of two major gene clusters. The cluster 1 comprised 1865 genes up regulated in JT myogenic precursors and cluster 2 comprised 758 genes down regulated in JT myogenic precursors.

JT myogenic precursors exhibit transcriptomic signature of activated state cell

DAVID analysis of the 1206 eligible genes from cluster 1 revealed significant enrichment (table 1) in genes involved in translation (p=2.8E-26), mitochondrial activity (p=3,85E-11) and oxidative phosphorylation (p=7,31E-12). Among other significant functional categories inferred from up regulated genes in JT myogenic precursors, we found the GO term mitotic cell cycle (p=2.26E-20). Genes belonging to this functional category included genes encoding cell division cycle (cdc) proteins (8), cyclin dependent kinases (6), cyclins (6), genes involved in chromosomes segregation (20) as shown in figure 3. Enrichment in gene involved in DNA metabolic process and replication such as minichromosome maintenance complex components, non-homologous end-joining factor1, DNA polymerases, DNA primases, DNA topoisomerases, replication proteins were also found. Cluster 1 also included many genes encoding epigenetic transcriptional regulators. Among them were Swi/Snf chromatin enzymes and several DNA (cytosine-5-)-methyltransferases. We found also many genes encoding extracellular components including collagens (14 genes), laminin subunits (3 genes) and entactin as well as genes contributing to the formation of the myofibrils (i.e, 8 genes encoding myosins, 5 genes encoding troponins, 2 genes encoding capping protein muscle Z-line and 3 genes encoding tropomyosins). At last, besides the large number of myofibrillary proteins, we found many genes involved in myoblast differentiation and fusion such as six1b, six4b, mef2d, myogenin, tmem8c (myomaker), muscle creatine kinase, caveolin 3, Dock5 (figure 4). Overall, cluster 1 showed enrichment in genes involved in protein synthesis, cell division and myogenic differentiation.

Genes associated with the quiescent state are down regulated in JT myogenic precursors

Cluster 2 comprised genes that were down regulated in JT myogenic precursors compared to both FJT and AT myogenic precursors. In this cluster, we identified genes of the Notch pathway, suggesting a repression of quiescent state. Associated with this quiescency state pathway we found jagged1b, jagged2b, dll4, dlc, notch1a, notch1b, notchl, her6 and hey1 among genes contained in cluster 2. We detected some genes which play repression roles in proliferation as hexim1b [25], stat3 [26], and Dach1 also known to inhibit Six protein activity [27]. Among the down regulated genes in JT myogenic precursors, we distinguished genes which plays repression roles in myogenic differentiation as ddit3 [28], trim33 [29], bhlhe40 [30], tal1 [31]. Moreover, a marker of quiescent satellite cells [32], nestin was down regulation in JT myogenic precursors. We also observed a global repression of the TGFβ pathway in JT myogenic precursors. Indeed, 7 genes involved in TGFβ pathway, were down regulated in JT myogenic precursors (tgfb2, tgfbr1, bmpr2b, bmpr1bb, smad3b, smad6a and acvrrl1) whereas 5 inhibitors of TGFβ pathway were up regulated in JT myogenic precursors (Bmp7a, gremlin2, dcn, fstl1b and fsta). Overall, cluster 2 showed enrichment in genes involved in inhibition of proliferation, repression of myogenic differentiation and maintenance of cellular quiescent state.

JT myogenic precursors have an enhanced intrinsic capacity of for in vitro proliferation

To know more about the intrinsic molecular properties of myogenic precursors of hyperplasic muscle compared to myogenic precursors of non-hyperplasic muscle, we carried out a primary cell culture of myogenic progenitors extracted from JT, FJT and AT conditions. Cell proliferation assays using BrdU showed a higher proliferation rate of JT myogenic precursors (40.1%) after two days of culture compared to FJT (0.8%) and AT (10.3%) myogenic precursors (figure 5). Then, to determine whether the transcriptomic activation signatures were related to a differential cell behavior regarding proliferating capacity, we also measured the proliferation rate of JT, FJT and AT myogenic cells at 5, 8 and 11 days after plating. In JT myogenic precursors the proliferation rate increased from D2 to reach a maximum rate at D5

with 61.4% of BrdU positive nuclei, then the proliferation rate decreased from D8 to 42.4% to D11 to 31.4%. In sharp contrast, proliferation rate of FJT myogenic precursors remained low and tended to increase up to 12,9% at D8. For AT myogenic precursors, the proliferation rate increased at D5 to 48.3% to almost reach the proliferation rate in JT myogenic precursors and decreased from D8 to 31.6% and at D11 to 19.1%. Thus, the kinetic of proliferation of the AT precursors was close to that one of JT but with a lower rate from D5 to D11. Overall, myogenic precursors of JT exhibit a global enhanced proliferation capacity under *in vitro* conditions compared to FJT and AT.

JT myogenic precursors have an enhanced capacity for in vitro myogenic differentiation

To go further on the characterization of the intrinsic molecular properties of myogenic precursors of hyperplastic muscle, we quantified the *in vitro* differentiation capacities of JT, FJT and AT myogenic precursors. At D2, we observed an extremely low differentiation rate in JT (1.4%), FJT (1%) and AT (1.6%) myogenic precursors (figure 6). Because of the low differentiation at D2, this result indicates that very few differentiated muscle cells (myocytes) were seeded at the beginning of the cell culture. Then, we also measured the differentiation rate at 5, 8 and 11 days after plating of JT, FJT and AT myogenic progenitors. In JT myogenic precursors the differentiation rate increased at D5 to 11.6%, D8 to 24.4% and reach a maximum rate at D11 with 28% of nuclei contained in myosin positive cells. In sharp contrast, the differentiation of FJT precursors remained very low during the first 8 days (<0.5%) then a differentiation resumption was observed at D11 (6.4%). For AT myogenic precursors, no significant increase of the differentiation rate was observed even after 11 days of culture. Overall, JT myogenic precursors exhibited a global enhanced differentiation capacity under *in vitro* conditions.

Evaluation of the expression level by qPCR of myogenin and myomaker after 2 days in cell culture validated the transcriptomic results as shown in figure 7. Indeed, the expression of myogenin and myomaker were higher in JT myogenic precursors compared to AT and FJT myogenic precursors. In addition, the expression level of myogenin and myomaker after 8 days in culture increase in FJT myogenic precursors. These were contrasting with expression

level in AT myogenic precursor that did not exhibit such an increase between D2 and D8. Overall, qPCR data validated our previous results with JT myogenic precursors as more engaged in differentiation program than AT and FJT myogenic precursors.

Discussion

Formation of new myofibres occurs lastingly in fish myotome. This process, termed hyperplasia, requires proliferation, differentiation and fusion of muscle stem cells (satellite cells) to form new multinucleated myofibres. We examined in this study the hypothesis that post-hatching muscle hyperplasia in fish is associated with an intrinsic physiological status of myogenic precursors predetermining them to self-renew and differentiate. For this purpose, we examined proliferation of trout satellite cells *in vivo* and compared gene expression profiling and *in vitro* myogenic potential of satellite cells extracted from juvenile trout muscle displaying intense hyperplastic growth (JT), with satellite cells extracted from trout muscle that no longer exhibited muscle hyperplasia, namely fasted juvenile trout (FJT) and adult trout (AT).

Many studies on mammalian isolated satellite cells were carried out on cells directly isolated from muscle and purified by FACS using fluorescent reporters or cell surface marker [33]. As these technologies cannot yet be used in trout fish, we took advantage of the specific adhesion of satellite cells on laminin substrate to enrich them in culture [19, 34]. Although it has been reported that isolation procedures alter gene expression of myogenic precursors [35, 36], we assumed in this study that the differential ex vivo properties of trout satellite cells originating either from hyperplastic or non-hyperplastic muscle, somehow reflect intrinsic differences preexisting before their extraction from muscle.

First, we sought to identify and quantify proliferative satellite cells in muscle of growing versus non-growing trout using *in vivo* BrdU injection followed by double immuno-labeling of laminin and BrdU. In agreement with Alfei *et al* (1989)[37], our results clearly evidenced a higher rate of BrdU positive cells in muscle of JT compared to FJT and AT, notably at sites corresponding to the satellite cell niche. This shows that fish hyperplastic muscle contains

proliferative satellite cells well after hatching, what sharply contrasts with the mitotic quiescence of satellite cells located in mature mouse muscle [38].

Relative to satellite cells from non-hyperplastic muscle, satellite cells from juvenile trout were found to exhibit up-regulated gene set related to high metabolic activity as shown by enrichment in genes involved in translational efficiency and genes encoding structural and functional components of mitochondria, notably those involved in energy production for execution of biosynthesis events. Mitochondrial biogenesis has been associated with the shift from quiescence to proliferation of satellite cells [39, 40]. In keeping with this, our result that matches meta-analyses of multiple transcriptomes revealing low expression of genes associated with oxidative phosphorylation in mouse quiescent satellite cells [41], supports the view that JT cells are intrinsically activated compared to satellite cells from non-hyperplastic muscle. Other major functional categories inferred from genes up-regulated in myogenic precursors derived from hyperplastic muscle were related to DNA replication and cell cycle. This finding, which is quite in agreement with the proliferation rate of these cells measured *in vivo* and ex vivo, strongly reinforces the view that satellite cells isolated from trout hyperplastic muscle are in an activated state. Also, several major genes signing myogenic differentiation were found to be overexpressed. Among them were myogenin which invalidation prevents myogenic differentiation in mouse [42] and myomaker which is necessary for myoblast fusion into myotube as shown by gene invalidation [15]. In keeping with this, it is interesting to note that mitochondrial activity, which is higher in JT satellite cells relative to FJT and AT cells, has been reported to positively regulate myogenesis [43]. Conversely, transcriptome of FJT and AT myogenic precursors, compared to that of JT myogenic precursors, revealed up regulation of genes involved in maintenance of stem cell quiescence, notably genes involved in Notch signaling [44] or known as marker of quiescent muscle stem cell. These results are in agreement with data obtained in mouse showing an up regulation of notch and Hey genes in quiescent satellite cells [45]. In addition, the up regulation of several genes involved in TGFbeta pathway was in line with a repression of differentiation of myogenic precursors [46]. Indeed, we notably observed an up-regulation of BMP receptor type 1 which knock-down in mouse satellite cells caused premature myogenic differentiation [47]. All these data support the view that satellite cells extracted from muscle

of fasted trout or adult trout are close to a quiescent state compared to satellite cells from juvenile trout.

Another major result of our study was that behavior of satellite cells from hyperplastic muscle quite differs from that of satellite cells extracted from non-hyperplastic muscle. Specifically, we found that cultured JT myogenic precursors exhibited higher proliferation rate and differentiation capacities than FJT and AT myogenic precursors. These observations, that match transcriptome data, further support the view that myogenic cells from hyperplastic muscle of juvenile trout are intrinsically more potent to form myofibres than satellite cells from non-hyperplastic muscle. Also, we found that the low proliferation rate of myogenic cells observed in fasted trout muscle was maintained *in vitro*, suggesting an intrinsic inhibition of myogenic precursor proliferation. However, differentiation of FJT myogenic precursors was only delayed because qPCR and immunofluorescence analysis showed resumption of differentiation after 8 days of culture. In contrast, AT myogenic precursors exhibited a strong proliferation capacity *in vitro* suggesting that AT myogenic precursors were not delayed or close to senescent state that could explain their low myogenic capacities as observed in old mouse [48]. All together, these results showed differences in functional capacities of the two quiescent myogenic precursor's cells that could be interesting to investigate at a molecular and cellular levels.

What could determine intrinsic myogenic capacity of JT cells ? One possible cause, inferred from transcriptome analysis, could relate to epigenetic regulations of transcription. Indeed, up-regulation of genes involved in DNA methylation was found in JT myogenic precursors, notably several DNA methyl transferase (dnmt1, 3ab and 3b) known to be involved in muscle stem cell activation [49]. Furthermore, as previously reported in hyperplastic growth zone of trout larvae [50] and in activated satellite cells of mouse and trout regenerating muscle [51], we observed in JT cells the overexpression of many SWI/SNF chromatin remodeling enzymes, which dynamic recruitment regulate many stages of myogenesis [52].

Conclusion

The satellite cells from muscle of trout juveniles exhibit *in vivo* and ex vivo features of activation that are not found in satellite cells isolated from non-hyperplastic muscle. Thus, muscle hyperplastic growth in fish likely relates to the fact that satellite cells in these animals are intrinsically potent to form myofibres well after hatching.

Methods

Animals

Rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) weighting from 2g to 2kg were raised to a 12 h light:12 h dark photoperiod and 12±1 °C in a recirculating rearing system located in the Laboratory of Physiology and Genomics of Fish. Fish were fed daily ad libitum on a commercial diet or starved during 3 or 4 weeks.

Measurement of satellite cells proliferation in situ

Intra-peritoneal injections (150µg/g of body weight) of BrdU (Roche, no. 280 879), dissolved in a solution composed with NaOH (0.02N) diluted with NaCl 0.9%, were performed on juvenile rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) (2g, n = 5), 4 weeks fasted juvenile rainbow trout (5g, n = 5) and 400-500g rainbow trout (n = 6) which have been reported to exhibit low hyperplasia [4].

Muscle tissues were fixed in Carnoy fixative solution for 48 h at 4°C, progressively dehydrated and embedded in paraffin. Transverse paraffin sections (10 µm thick) were stained with laminin antibody (1:50, DSHB, D18-c) and BrdU labeling and detection kit (Roche Diagnostics, no. 11 296 736 001) was used following the recommendations of manufacturer to measure the proliferation of the cells. Briefly, tissues were incubated for 30 min at 37 °C with mouse IgG1 anti-BrdU (1:10, kit: 11296736001, Sigma) and, after 1h incubation at room temperature in saturation buffer (BSA 1%, 04-100-811C in PBST 0.1%), tissues were incubated overnight at

4°C with mouse IgG2a anti-laminin (1:1000, DSHB, D18-c). The secondary antibody were diluted (1:1000, Alexa 488 anti-IgG1 mouse A21121 to detect BrdU and Alexa 594 anti-IgG2a mouse A21135 to detect laminin) in PBST and applied for 1 h at room temperature. Tissues were then mounted in Mowiol containing 0.5 µg/ml of DAPI. Tissues cross sections were photographed using a Nikon digital camera coupled to a Nikon Eclipse 90i microscope. At least five images were taken per tissues and the number of nuclei BrdU positive localized between basal lamina and myofiber on the total number of nuclei under basal lamina (myo-nuclei) were calculated using cell counter plugin in Fiji software.

Isolation of trout precursor myogenic cells

For all studies, myogenic precursors were isolated from dorsal part of the white muscle of juvenile trout (5g, JT), of 3-4 weeks fasted juvenile rainbow trout (5g, FJT) and of adult rainbow trout (1.5-2kg, AT) as previously described [19]. The yield of cell extracted was lower in adult than in juvenile (JT: 1,6x106 cells/g of muscle; FJT: 1,4x106 cells/g of muscle; AT : 1,1x105 cells/g of muscle). Isolated myogenic precursors were plated on poly-L-lysine and laminin-coated plates at 80,000 cells per cm2 for every analysis except to proliferation measurement which were 60,000 cells per cm^2.

Gene expression analysis

Using TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), total RNA were extracted from cells according to the manufacturer's recommendations. The total RNA (200ng) were reverse transcribed into cDNA using the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit, (Applied Biosystems) and random primers, according to the manufacturer's instructions. Target gene expression levels were determined by qPCR using specific primers (forward primer sequences; myogenin : AGCAGGAGAACGACCAGGGAAC, myomaker : AATCACTGTCAAATGGTTACAGA, and reverse primer sequences ; myogenin : GTGTTGCTCCACTCTGGGCTG, myomaker : GTAGTCCCACTCCTCGAAGT). Primers were design on two exons (myogenin) or in exon-exon boundaries (myomaker) to avoid genomic amplification. Quantitative PCR was performed on a StepOnePlus thermocycler (Applied Biosystems) using SYBR FAST qPCR Master Mix

(PowerUp SYBR Green Master Mix kit, A25742, Applied Biosystems). Relative quantification of the target gene transcripts was made using 18S gene expression as reference. Quantitative PCR was performed using 10 µl of the diluted cDNA mixed with 300nM of each primer in a final volume of 20 µl. The PCR protocol was initiated at 95°C for 3 min for initial denaturation followed by the amplification steps (20 sec at 95°C followed by 30 sec at 60°C) repeated 40 times. Melting curves were systematically monitored at the end of the last amplification cycle to confirm the specificity of the amplification reaction. The efficiency of the qPCR was about 80-100%. Each PCR run included replicate samples (duplicate of PCR amplification) and negative controls (RNA-free samples, NTC). Data are presented as the ratio between the relative expression of the target gene and 18S.

Microarray slides

An Agilent-based microarray platform with 8 × 60K probes per slide was used (GEO platform record: GPL24910). Microarray data sets have been submitted to the GEO-NCBI with the accession number: GSE113758.

RNA labeling and hybridization

RNA samples (N=5-6) from 24H-cultured myogenic precursors from juvenile trout (JT), from 3-4 weeks fasted juvenile trout (FJT) and from adult trout (AT) were used for labelling and hybridization. For each sample, 150ng of RNA was Cy3-labelled according to the manufacturer's instructions (One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis (Low Input Quick Amp Labeling) Agilent protocol). Briefly, RNA was first reverse transcribed, using a polydT-T7 primer, Cy3 was incorporated by a T7 polymerase-mediated transcription and excess dye was washed using an RNeasy kit (Quiagen). The level of dye incorporation was evaluated using a spectrophotometer (Nanodrop ND1000, LabTech). 600 ng of labelled cRNA was then fragmented in the appropriate buffer (Agilent) for 30 minutes at 60°C before dilution (v/v) in hybridization buffer. Hybridizations were performed in a microarray hybridization oven (Agilent) for 17h at 65°C, using two Agilent 8×60K high-density

oligonucleotide microarray slides. Following hybridization, the slides were rinsed in gene expression wash buffers 1 and 2 (Agilent).

Data acquisition and analysis

Hybridized slides were scanned at a 3-µm resolution using the Agilent DNA microarray Scanner. Data were extracted using the standard procedures contained in the Agilent Feature Extraction (FE) software version 10.7.3.1. One AT sample that did not give good quality signal on microarray was discarded from the gene expression analysis. Arrays were normalized using GeneSpring software version 14.5. Using R software (3.2.2) a LIMMA (3.26.9) statistical test [24] (BH corrected p-val < 0.001) was used to find differentially expressed genes between FJT and AT. Secondly, two LIMMA statistical tests (BH corrected p-val < 0.001) were used to find differentially expressed genes between JT and FJT, and between JT and AT. We kept significant differentially expressed genes with an expression mean in at least one condition above or equal to 6, corresponding at 3 times background (normalized values). Thirdly, we kept commons genes found in this two differential analysis in the same regulation way with JT as referential condition. For clustering analysis, log transformed values were median-centred and an average linkage clustering was carried out using CLUSTER 3.0 software and the results were visualized with TreeView software (https://sourceforge.net/projects/jtreeview/files/). GO enrichment analysis was performed using Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID 6.7) software tools.

Analysis of cell proliferation

Cells were cultured in presence of 10µM BrdU during 24H before sampling and cells were collected at days 2, 5, 8 and 11. The cells were fixed with ethanol/glycine buffer (100% ethanol, 50 mM glycine, pH 2). A BrdU labeling and detection kit (11296736001, Sigma) was used following the recommendations of manufacturer to measure the proliferation of the cells. Briefly, the cells were incubated for 30 min at 37 °C with mouse anti-BrdU, washed, and then incubated with the secondary antibody anti-mouse FITC for 30 min. Cells were then mounted in Mowiol containing 0.5 µg/ml DAPI. Cells were photographed using a Nikon digital

camera coupled to a Nikon Eclipse 90i microscope. Seven images were taken per well and the number of BrdU positive nuclei on the total number of nuclei was automatically calculated using a macro command on Visilog (6.7) software.

Analysis of cell differentiation

On days 2, 5, 8 and 11 of culture, cells on glass coverslips were briefly washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) and fixed for 30 min with 4% paraformaldehyde in PBS. After three washes, cells were saturated for 1 h with 3% BSA, 0.1% Tween-20 in PBS (PBST). Cells were incubated at room temperature for 3 h with the primary antibody anti-myosin heavy chain (MyHC, DSHB, MF20-c, 1:50) in blocking buffer [19]. The secondary antibody were diluted (1:1000, Alexa 488 A11001) in PBST and applied for 1 h at room temperature. Cells were mounted with Mowiol containing DAPI (0.5 µg/ml). Cells were photographed using a Nikon digital camera coupled to a Nikon Eclipse 90i microscope. Five images were taken per well and the number of nuclei contained in MyHC positive cells on the total number of nuclei was automatically calculated using a macro command on Visilog (6.7) software.

Statistical analysis

A two-way ANOVA analysis (time and conditions as factors) with a Tukey's post hoc multiple comparisons test was performed on qPCR data, proliferation ratio and differentiation ratio. A Kruskal-Wallis test with a Dunn's post hoc multiple comparisons test was performed on *in situ* satellite cells proliferation data. A p-value below 0.05 was considered significant. All the statistical analyses were performed with the R packages (3.5.1 version).

Declarations

Ethics approval

Fish used in this study were reared and handled in strict accordance with French and European policies and guidelines of the Institutional Animal Care and Use Committee (no. 3312-20 15121511 022362 and 3313-20 15121511 094929), which approved this study.

Availability of data and material

Gene expression data supporting the results of this article are available in the Gene Expression Omnibus (GEO) repository under the accession number: GSE113758.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Funding

This research were funded by National Institute of Agronomic Research (INRA).

Authors' contributions

JCG conceived and supervised the study. SJ, AL and NS performed the experiments. SJ, PYR and JCG analysed the data. JB helped for cell proliferation and differentiation quantification. SJ, PYR and JCG wrote the paper. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The fellowship of Sabrina Jagot was supported by INRA PHASE and the Région Bretagne. We also thank C. Duret for husbandry of injected trout.

References

1. Rowlerson A, Mascarello F, Radaelli G, Veggetti A. Differentiation and growth of muscle in the fish Sparus aurata (L): II. Hyperplastic and hypertrophic growth of lateral muscle from hatching to adult. Journal of Muscle Research & Cell Motility. 1995;16:223–36.

2. Koumans JTM, Akster HA, Booms GHR, Osse JWM. Growth of carp (Cyprinus carpio) white axial muscle; hyperplasia and hypertrophy in relation to the myonucleus/sarcoplasm ratio and the occurrence of different subclasses of myogenic cells. Journal of Fish Biology. 1993;43:69–80.

3. Veggetti A, Mascarello F, Scapolo PA, Rowlerson A. Hyperplastic and hypertrophic growth of lateral muscle in Dicentrarchus labrax (L.). Anatomy and Embryology. 1990;182:1–10.

4. Stickland NC. Growth and development of muscle fibres in the rainbow trout (Salmo gairdneri). Journal of Anatomy. 1983;137 Pt 2:323–33.

5. Rescan P-Y, Rallière C, Lebret V, Fretaud M. Analysis of muscle fibre input dynamics using a myog:GFP transgenic trout model. Journal of Experimental Biology. 2015;218:1137–42.

6. Johnston IA, Lee H-T, Macqueen DJ, Paranthaman K, Kawashima C, Anwar A, et al. Embryonic temperature affects muscle fibre recruitment in adult zebrafish: genome-wide changes in gene and microRNA expression associated with the transition from hyperplastic to hypertrophic growth phenotypes. J Exp Biol. 2009;212:1781.

7. Rowlerson A, Veggetti A. Cellular mechanisms of Post-Embryonic Muscle Growth in Aquaculture Species. In: Muscle development and growth. Academic Press; 2001. p. 103–40.

8. Gabillard J-C, Kamangar BB, Montserrat N. Coordinated regulation of the GH/IGF system genes during refeeding in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Journal of Endocrinology. 2006;191:15–24.

9. Fauconneau B, Paboeuf G. Effect of fasting and refeeding on in vitro muscle cell proliferation in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Cell Tissue Res. 2000;301:459–63.

10. Mauro A. SATELLITE CELL OF SKELETAL MUSCLE FIBERS. The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology. 1961;9:493–5.

11. Miller JB, Schaefer L, Dominov JA. 6 Seeking Muscle Stem Cells. In: Pedersen RA, Schatten GP, editors. Current Topics in Developmental Biology. Academic Press; 1998. p. 191–219. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0070215308603828.

12. Dumont NA, Wang YX., Rudnicki MA. Intrinsic and extrinsic mechanisms regulating satellite cell function. Development. 2015;142:1572–81.

13. Yablonka-Reuveni Z, Rivera AJ. Temporal Expression of Regulatory and Structural Muscle Proteins during Myogenesis of Satellite Cells on Isolated Adult Rat Fibers. Developmental biology. 1994;164:588–603.

14. Zammit PS, Partridge TA, Yablonka-Reuveni Z. The Skeletal Muscle Satellite Cell: The Stem Cell That Came in From the Cold. J Histochem Cytochem. 2006;54:1177–91.

15. Millay DP, O'Rourke JR, Sutherland LB, Bezprozvannaya S, Shelton JM, Bassel-Duby R, et al. Myomaker is a membrane activator of myoblast fusion and muscle formation. Nature. 2013;499:301.

16. Koumans JTM, Akster HA. Myogenic cells in development and growth of fish. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology. 1995;110:3–20.

17. Gurevich DB, Nguyen PD, Siegel AL, Ehrlich OV, Sonntag C, Phan JMN, et al. Asymmetric division of clonal muscle stem cells coordinates muscle regeneration in vivo. Science. 2016;353. doi:10.1126/science.aad9969.

18. Koumans JTM, Akster HA, Booms RGH, Osse JWM. Influence of fish size on proliferation and differentiation of cultured myosatellite cells of white axial muscle of carp (Cyprinus carpio L.). Differentiation. 1993;53:1–6.

19. Gabillard J, Sabin N, Paboeuf G. In vitro characterization of proliferation and differentiation of trout satellite cells. Cell Tissue Res. 2010;342:471–7.

20. Duran BO da S, Fernandez GJ, Mareco EA, Moraes LN, Salomão RAS, Gutierrez de Paula T, et al. Differential microRNA Expression in Fast- and Slow-Twitch Skeletal Muscle of Piaractus mesopotamicus during Growth. PLOS ONE. 2015;10:e0141967.

21. Wang T, Wang X, Zhou H, Jiang H, Mai K, He G. The Mitotic and Metabolic Effects of Phosphatidic Acid in the Primary Muscle Cells of Turbot (Scophthalmus maximus). Frontiers in Endocrinology. 2018;9:221.

22. Bower NI, Taylor RG, Johnston IA. Phasing of muscle gene expression with fasting-induced recovery growth in Atlantic salmon. Frontiers in Zoology. 2009;6:1–13.

23. Montserrat N, Gabillard JC, Capilla E, Navarro MI, Gutierrez J. Role of insulin, insulin-like growth factors, and muscle regulatory factors in the compensatory growth of the trout (Oncorhynchus mykiss). Gen Comp Endocrinol. 2007;150. doi:10.1016/j.ygcen.2006.11.009.

24. Smyth G, Thorne N, Wettenhall J. limma: Linear Models for Microarray Data User's Guide. 2004.

25. Hong P, Chen K, Huang B, Liu M, Cui M, Rozenberg I, et al. HEXIM1 controls satellite cell expansion after injury to regulate skeletal muscle regeneration. The Journal of Clinical Investigation. 2012;122:3873–87.

26. Zhu H, Xiao F, Wang G, Wei X, Jiang L, Chen Y, et al. STAT3 Regulates Self-Renewal of Adult Muscle Satellite Cells during Injury-Induced Muscle Regeneration. Cell Reports. 2016;16:2102–15.

27. Pallafacchina G, François S, Regnault B, Czarny B, Dive V, Cumano A, et al. An adult tissue-specific stem cell in its niche: A gene profiling analysis of in vivo quiescent and activated muscle satellite cells. Stem Cell Research. 2010;4:77–91.

28. Alter J, Bengal E. Stress-Induced C/EBP Homology Protein (CHOP) Represses MyoD Transcription to Delay Myoblast Differentiation. PLoS ONE. 2011;6:e29498.

29. Mohassel P, Rosen P, Casciola-Rosen L, Pak K, Mammen AL. Expression of the Dermatomyositis Autoantigen TIF1γ in Regenerating Muscle. Arthritis & rheumatology (Hoboken, NJ). 2015;67:266–72.

30. Wang C, Liu W, Liu Z, Chen L, Liu X, Kuang S. Hypoxia Inhibits Myogenic Differentiation through p53 Protein-dependent Induction of Bhlhe40 Protein. The Journal of Biological Chemistry. 2015;290:29707–16.

31. Wang L, Jia Y, Rogers H, Wu Y-P, Huang S, Noguchi CT. GATA-binding Protein 4 (GATA-4) and T-cell Acute Leukemia 1 (TAL1) Regulate Myogenic Differentiation and Erythropoietin Response via Cross-talk with Sirtuin1 (Sirt1). Journal of Biological Chemistry. 2012;287:30157–69.

32. Day K, Shefer G, Richardson JB, Enikolopov G, Yablonka-Reuveni Z. Nestin-GFP reporter expression defines the quiescent state of skeletal muscle satellite cells. Developmental biology. 2007;304:246–59.

33. Gayraud-Morel B, Pala F, Sakai H. Isolation of muscle stem cells from mouse skeletal muscle. Methods Mol Biol Clifton NJ. 2017;1556. doi:10.1007/978-1-4939-6771-1_2.

34. Foster RF, Thompson JM, Kaufman SJ. A laminin substrate promotes myogenesis in rat skeletal muscle cultures: Analysis of replication and development using antidesmin and anti-BrdUrd monoclonal antibodies. Developmental Biology. 1987;122:11–20.

35. Machado L, Esteves de Lima J, Fabre O. *In situ* Fixation Redefines Quiescence and Early Activation of Skeletal Muscle Stem Cells. Cell Stem Cell. 2017;21.

36. Van den Brink SC, Sage F. Single-cell sequencing reveals dissociation-induced gene expression in tissue subpopulations. Nat Methods. 2017;14. doi:10.1038/nmeth.4437.

37. Alfei L, Maggi F, Parvopassu F, Bertoncello G, Vita R. Postlarval muscle growth in fish: A DNA flow cytometric and morphometric analysis. 1989.

38. Schultz Edward, Gibson Marcia C., Champion Thomas. Satellite cells are mitotically quiescent in mature mouse muscle: An EM and radioautographic study. Journal of Experimental Zoology. 1978;206:451–6.

39. Rocheteau P, Gayraud-Morel B, Siegl-Cachedenier I, Blasco MA, Tajbakhsh S. A Subpopulation of Adult Skeletal Muscle Stem Cells Retains All Template DNA Strands after Cell Division. Cell. 2012;148:112–25.

40. Rodgers JT, King KY, Brett JO, Cromie MJ, Charville GW, Maguire KK, et al. mTORC1 controls the adaptive transition of quiescent stem cells from G0 to GAlert. Nature. 2014;510:393–6.

41. Pietrosemoli N, Mella S, Yennek S, Baghdadi MB, Sakai H, Sambasivan R, et al. Comparison of multiple transcriptomes exposes unified and divergent features of quiescent and activated skeletal muscle stem cells. Skeletal Muscle. 2017;7:28.

42. Hasty P, Bradley A, Morris JH, Edmondson DG, Venuti JM, Olson EN, et al. Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene. Nature. 1993;364:501.

43. Wagatsuma A, Sakuma K. Mitochondria as a Potential Regulator of Myogenesis. The Scientific World Journal. 2013;2013:593267.

44. Mourikis P, Sambasivan R, Castel D, Rocheteau P, Bizzarro V, Tajbakhsh S. A Critical Requirement for Notch Signaling in Maintenance of the Quiescent Skeletal Muscle Stem Cell State. STEM CELLS. 2012;30:243–52.

45. Fukada S, Uezumi A, Ikemoto M, Masuda S, Segawa M, Tanimura N, et al. Molecular Signature of Quiescent Satellite Cells in Adult Skeletal Muscle. STEM CELLS. 2007;25:2448–59.

46. Liu D, Black BL, Derynck R. TGF-β inhibits muscle differentiation through functional repression of myogenic transcription factors by Smad3. Genes & Development. 2001;15:2950–66.

47. Ono Y, Calhabeu F, Morgan JE, Katagiri T, Amthor H, Zammit PS. BMP signalling permits population expansion by preventing premature myogenic differentiation in muscle satellite cells. Cell Death and Differentiation. 2011;18:222–34.

48. Chargé SBP, Brack AS, Hughes SM. Aging-related satellite cell differentiation defect occurs prematurely after Ski-induced muscle hypertrophy. American Journal of Physiology-Cell Physiology. 2002;283:C1228–C1241.

49. Laker RC, Ryall JG. DNA Methylation in Skeletal Muscle Stem Cell Specification, Proliferation, and Differentiation. Stem Cells International. 2016;2016:5725927.

50. Rescan P-Y, Montfort J, Fautrel A, Ralliere C, Lebret V. Gene expression profiling of the hyperplastic growth zones of the late trout embryo myotome using laser capture microdissection and microarray analysis. BMC Genomics. 2013;14:173.

51. Montfort J, Le Cam A, Gabillard J-C, Rescan P-Y. Gene expression profiling of trout regenerating muscle reveals common transcriptional signatures with hyperplastic growth zones of the post-embryonic myotome. BMC Genomics. 2016;17:810.

52. Toto PC, Puri PL, Albini S. SWI/SNF-directed stem cell lineage specification: dynamic composition regulates specific stages of skeletal myogenesis. Cellular and molecular life sciences : CMLS. 2016;73:3887–96.

Figures

GO terms Biological Process		Number of genes	p-value	p.adj (Benjamini)
GO:0006412	translation	84	2,82E-26	8.17E-23
GO:0006119	oxidative phosphorylation	30	7,31E-12	6.63E-9
GO:0042775	mitochondrial ATP synthesis coupled electron transport	22	3,85E-11	6.56E-9
GO:0000278	mitotic cell cycle	80	2,26E-20	2.18E-17
GO:0000280	nuclear division	51	2,38E-14	1.15E-11
GO:0048285	organelle fission	52	3,10E-14	1.28E-11
GO:0007059	chromosome segregation	20	1,65E-06	1.64E-4
GO:0006260	DNA replication	30	3,83E-05	2.92E-3
GO:0006259	DNA metabolic process	61	2,01E-05	1.67E-3
GO terms Cellular Component		**Number of genes**	**p-value**	**p.adj (Benjamini)**
GO:0005840	ribosome	72	1,61E-29	4.51E-27
GO:0030529	ribonucleoprotein complex	102	1,59E-21	1.49E-19
GO:0005739	mitochondrion	211	1,77E-44	9.93E-42
GO:0070469	respiratory chain	29	6,83E-14	2.39E-12
GO:0005839	proteasome core complex	10	3,84E-06	6.74E-5
GO:0000776	kinetochore	16	3,10E-04	4.04E-3
GO:0030017	sarcomere	13	4,64E-02	0.31

Table 1: Functional categories inferred from up regulated genes in JT myogenic precursors. Table of the most significant Gene Ontology terms in Biological Process and Cellular Component that were found following functional enrichment analysis (DAVID Software 6.7) among genes up regulated in JT myogenic precursors.

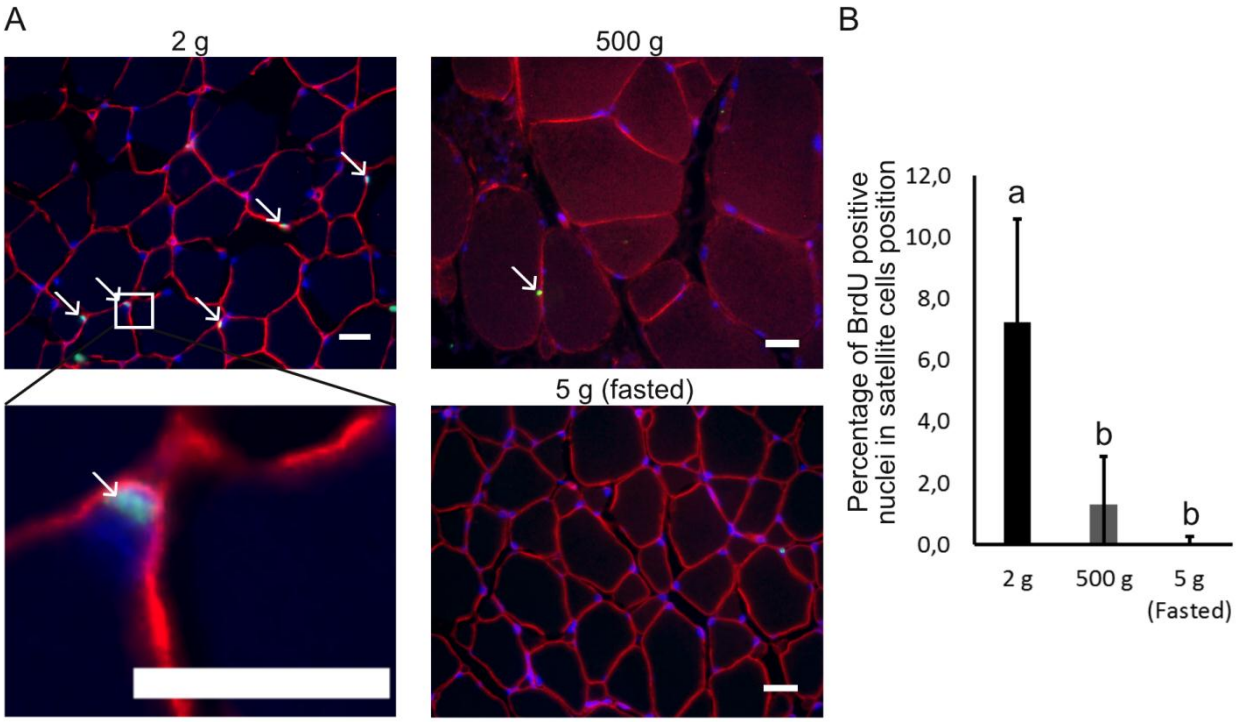

Figure 1: Quantification of satellite cells proliferation in hyperplasic and non-hyperplasic muscle of trout (A) Muscle cross sections stained with anti-laminin (red) and anti-BrdU (green) in trout of 2g, 500g and of 3-weeks fasted trout (5g). Nuclei were counter-stained with DAPI (blue) (scale bar = 20µm). (B) Quantification of BrdU positive nuclei (% ±SD) in satellite cells position, (under the basal lamina), in white muscle of trout weighing 2g, 500g and of 3-weeks fasted trout weighing 5g. Different letters indicates a significant difference between means (Kruskal-Wallis and Dunn's multiple comparisons test; p-value ≤ 0.05; n = 5).

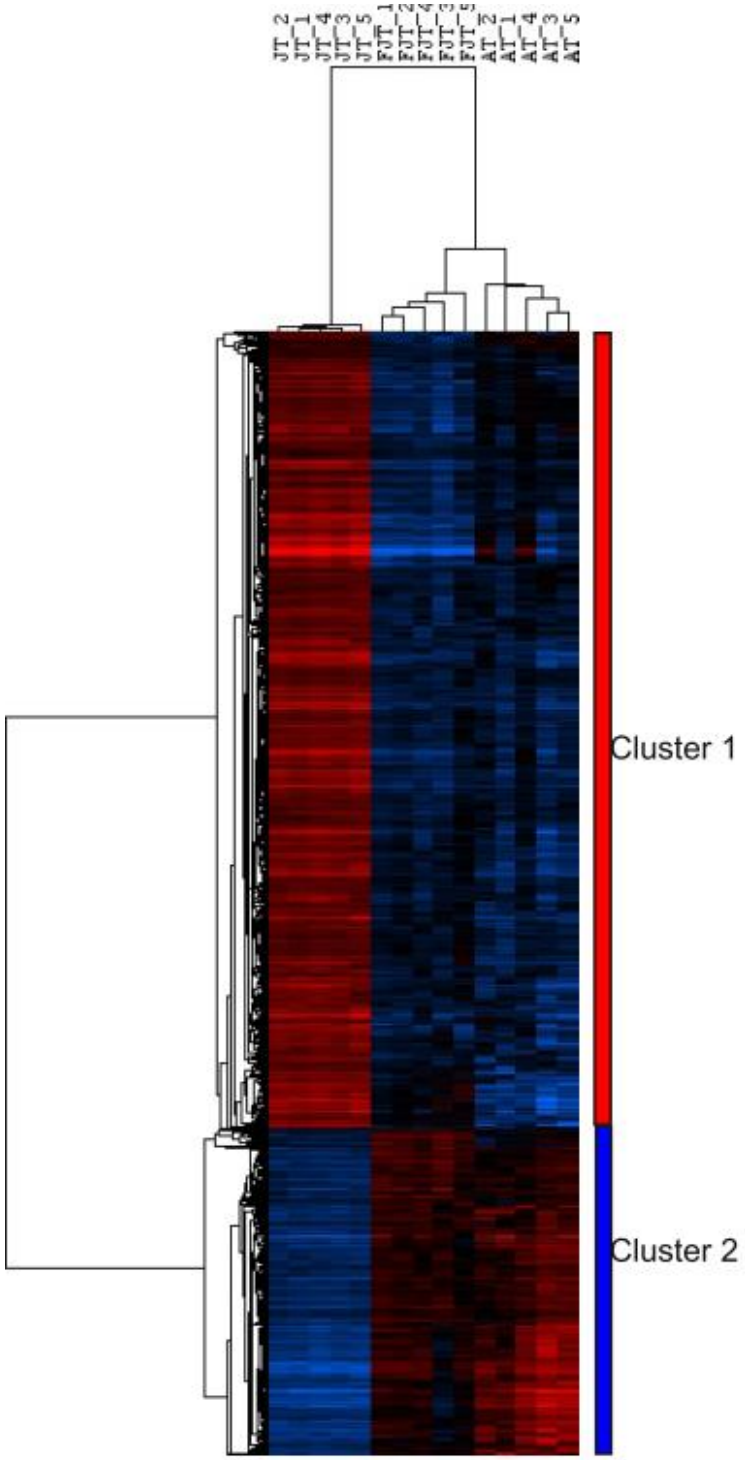

Figure 2: Hierarchical clustering of differentially expressed genes between JT myogenic precursors and FJT and AT myogenic precursors. Each row represents the expression pattern of a single gene and each column corresponds to a single sample: columns 1 to 5: JT myogenic precursors sampled; columns 6 to 10: FJT myogenic precursors sampled; and columns 11 to 15: AT myogenic precursors sampled. The expression levels are represented by colored tags, with red representing the highest levels of expression and blue representing the lowest levels of expression.

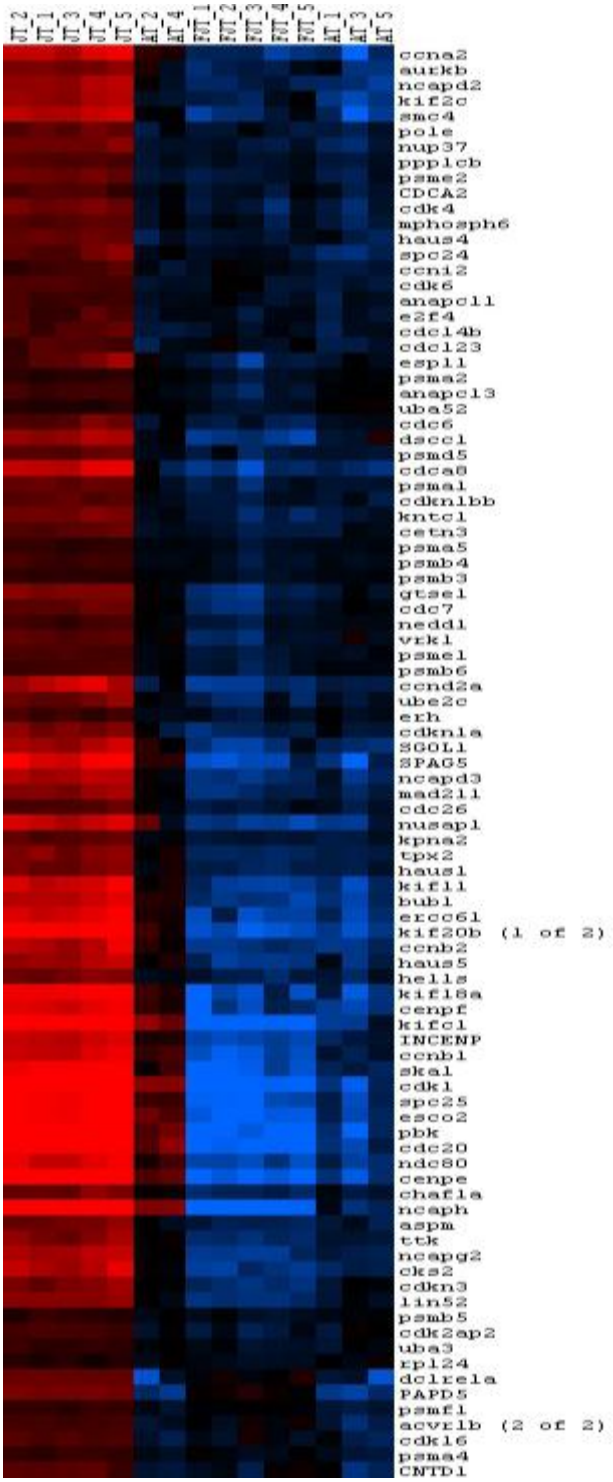

Figure 3: Hierarchical clustering of differentially expressed cell cycle genes between JT myogenic precursors and FJT and AT myogenic precursors. Each row represents the expression pattern of a single gene and each column corresponds to a single sample: columns 1 to 5: JT myogenic precursors sampled; columns 6 to 10: FJT myogenic precursors sampled; and columns 11 to 15: AT myogenic precursors sampled. The expression levels are represented by colored tags, with red representing the highest levels of expression and blue representing the lowest levels of expression.

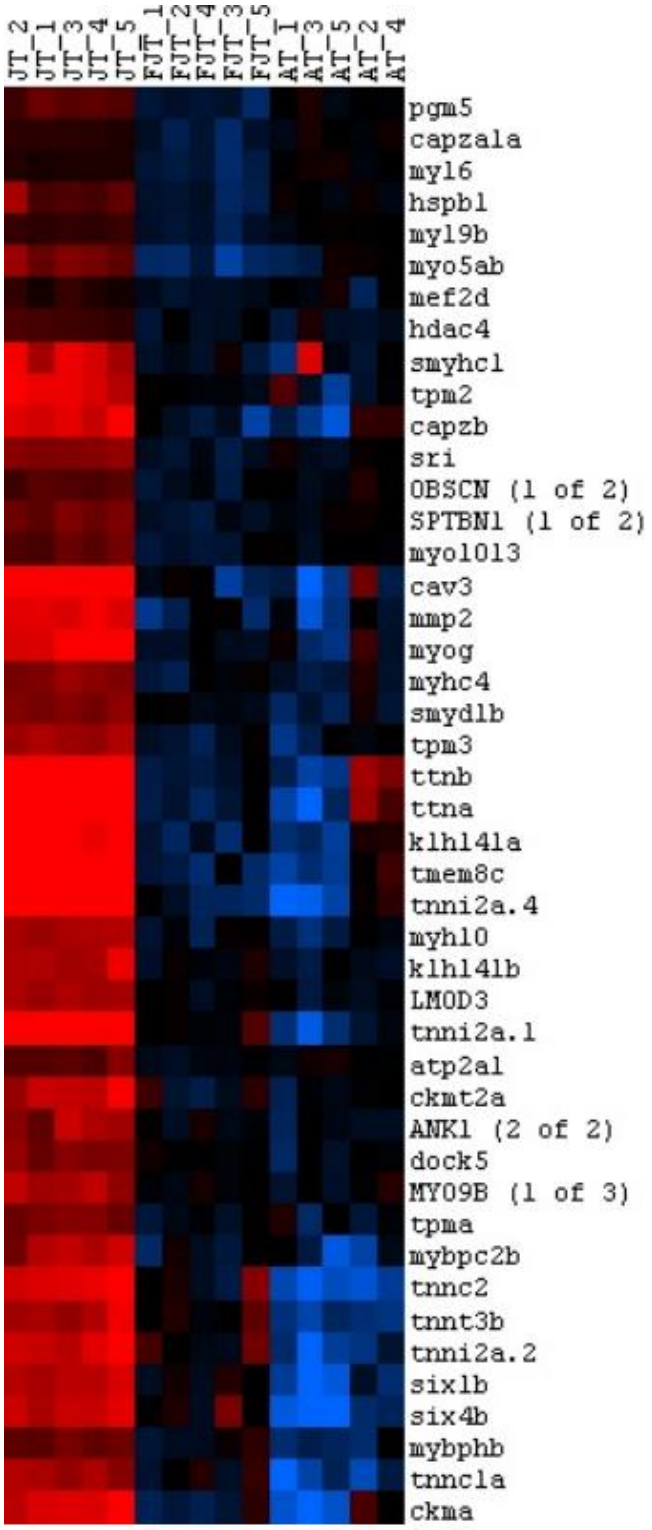

Figure 4: Hierarchical clustering of differentially expressed myogenic genes between JT myogenic precursors and FJT and AT myogenic precursors. Each row represents the expression pattern of a single gene and each column corresponds to a single sample: columns 1 to 5: JT myogenic precursors sampled; columns 6 to 10: FJT myogenic precursors sampled; and columns 11 to 15: AT myogenic precursors sampled. The expression levels are represented by colored tags, with red representing the highest levels of expression and blue representing the lowest levels of expression.

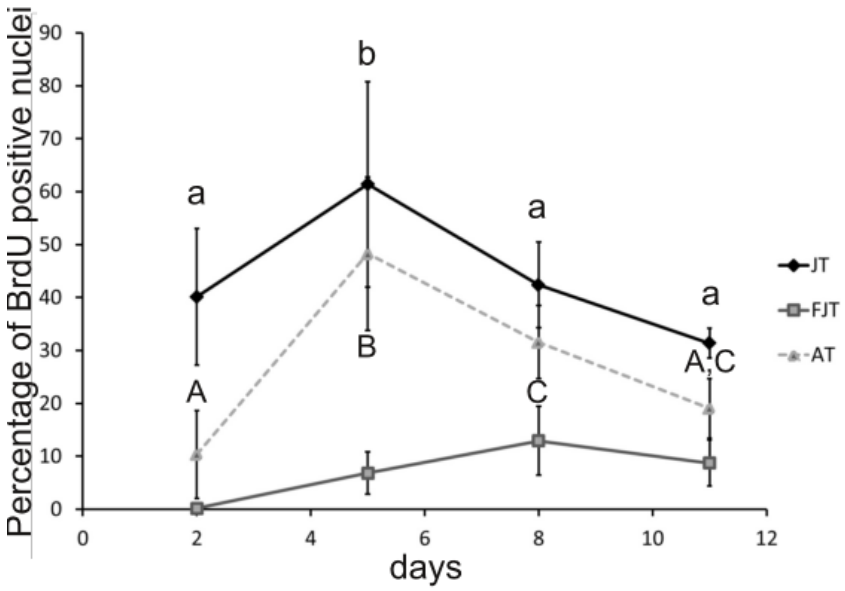

Figure 5: Proliferation rate of JT, FJT and AT myogenic precursors after 2, 5, 8, 11 days of plating (D2, D5, D8 and D11). *Each point represents the mean (% ±SD) of BrdU positive nuclei ratio for each condition at D2, D5, D8 and D11. Different letters indicates a significant difference between means (two-way ANOVA and Tukey's multiple comparisons test; p-value ≤ 0.05; n ≥ 5).*

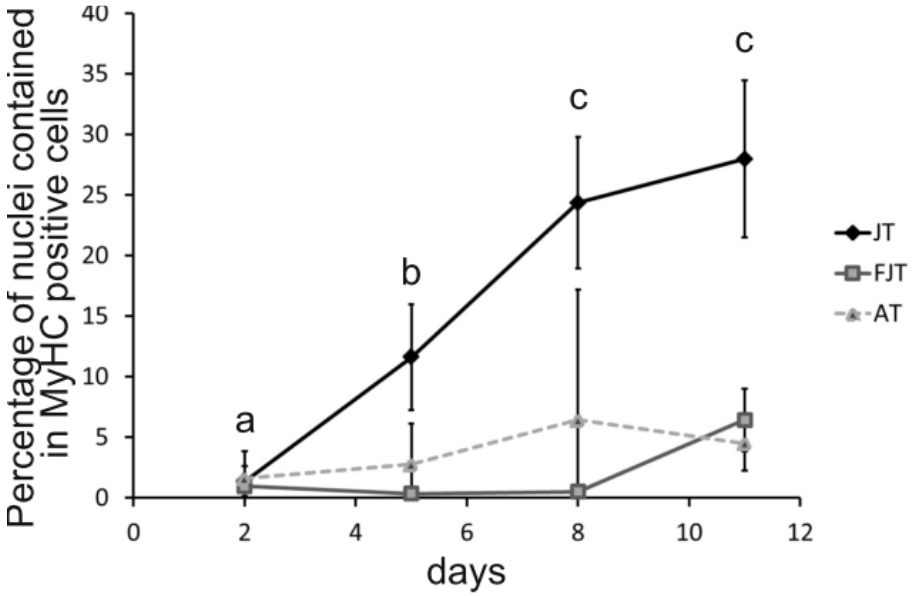

Figure 6: Differentiation rate of JT, FJT and AT myogenic precursors after 2, 5, 8, 11 days in culture (D2, D5, D8 and D11). *Each point represents the mean (% ±SD) of the percentage of nuclei contained in MyHC positive cells for each condition at D2, D5, D8 and D11. Different letters indicates a significant difference between means (two-way ANOVA and Tukey's multiple comparisons test; p-value ≤ 0.05; n ≥ 6).*

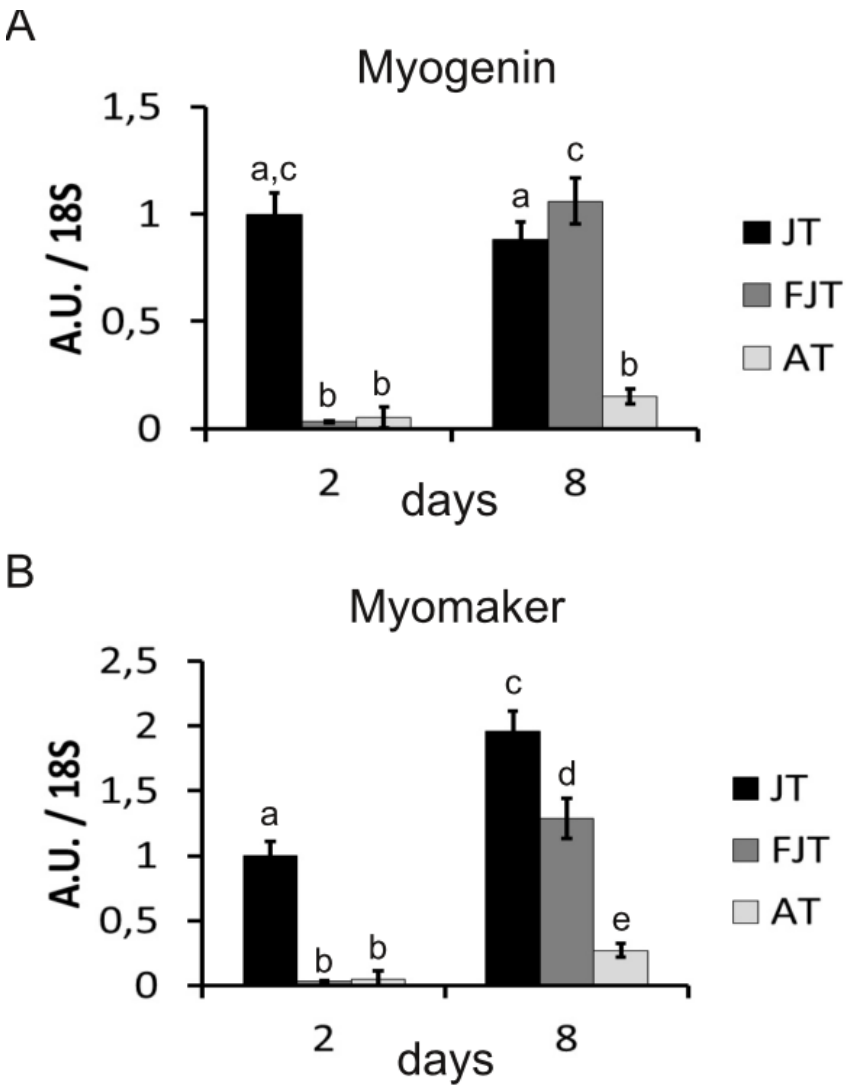

Figure 7: Quantification of the expression of myogenin and myomaker in JT, FJT and AT myogenic precursors. *Each bar represents the mean (AU ±SD) of the expression of myogenin (A) and myomaker (B) normalized by the expression mean of 18S as referential gene for each condition at D2 and D8. Different letters indicates a significant difference between means (two-way ANOVA and Tukey's multiple comparisons test; p-value ≤ 0.05; n ≥ 4).*

Supplemental data file 1: Differentially expressed genes in myogenic precursors from hyperplastic muscle vs non hyperplastic muscle. Heat map file for Java treeview visualisation of hierarchical clustering of differentially expressed genes in JT myogenic precursors from hyperplastic muscle vs non hyperplastic muscle (FJT and AT). (CDT 496 ko).

Chapitre 2 : Des signatures transcriptomiques distinctes sont associées aux différences de comportement *in vitro* des précurseurs myogéniques issus de truites juvéniles à jeun et adultes.

Chez un grand nombre de poissons téléostéens comme la truite, la croissance globale et musculaire est continue (Mommsen, 2001). Contrairement aux mammifères, la croissance post-larvaire des poissons résulte d'une hypertrophie et d'une hyperplasie. Après la maturation sexuelle, le muscle de la truite adulte ne présente plus de croissance hyperplasique, seule persiste la croissance hypertrophique (Rescan et al., 2015).

Les cellules souches musculaires sont nécessaires à la formation de nouvelles fibres. Ces cellules sont quiescentes dans le muscle de mammifère adulte. Dans le chapitre précédent, nous avons montré que les précurseurs myogéniques extraits de muscle de truite en croissance hyperplasique sont dans un état activé contrairement aux précurseurs myogéniques extraits de muscle non-hyperplasique. Les précurseurs myogéniques extraits de truites adultes (AT) ainsi que les précurseurs myogéniques extraits de truites juvéniles à jeun (FJT) présentaient, eux aussi, un transcriptome caractéristique d'un état de quiescence. Curieusement, les analyses *in vitro* montrent des capacités de prolifération et de différenciation différentes entre les précurseurs myogéniques extraits de truites adultes et ceux de truites juvéniles à jeun. En effet, les précurseurs myogéniques AT présentent une capacité de prolifération nettement supérieure à celle des précurseurs myogéniques FJT, alors que leur capacité de différenciation est très faible.

L'objectif de ce chapitre est donc d'identifier des signatures transcriptomiques associées aux différences de comportement *in vitro.* A cet effet, nous caractériserons de manière approfondie le transcriptome spécifique des précurseurs myogéniques AT et des précurseurs myogéniques FJT.

2.1. Les précurseurs myogéniques quiescents extraits de muscle adulte et de truites juvéniles à jeun ont une signature transcriptomique spécifique.

Dans le chapitre 1, l'analyse transcriptomique réalisée entre les précurseurs myogéniques FJT et AT, révélait seulement 64 gènes différentiellement exprimés avec des conditions très stringentes (FDR de 0,001). Pour mieux caractériser leurs différences, sur le plan expressionnel, nous avons décidé d'abaisser le seuil du FDR ($p<0,05$; gestion des faux positifs) et de ne garder que les gènes différentiellement exprimés avec un fold change supérieur ou égale à 1,5. Ainsi, cette nouvelle analyse différentielle a identifié 806 gènes différentiellement exprimés entre les précurseurs myogéniques AT et FJT.

Ces gènes différentiellement exprimés ont été, par la suite, regroupés en fonction de la similarité de leur profil d'expression. Cette classification hierarchique (figure 11) montre deux sous clusters principaux : le cluster 1, composé de 531 gènes sous-exprimés dans les précurseurs myogéniques FJT et surexprimé dans les précurseurs myogéniques AT, et le cluster 2, composé de 275 gènes surexprimés dans les précurseurs myogéniques AT.

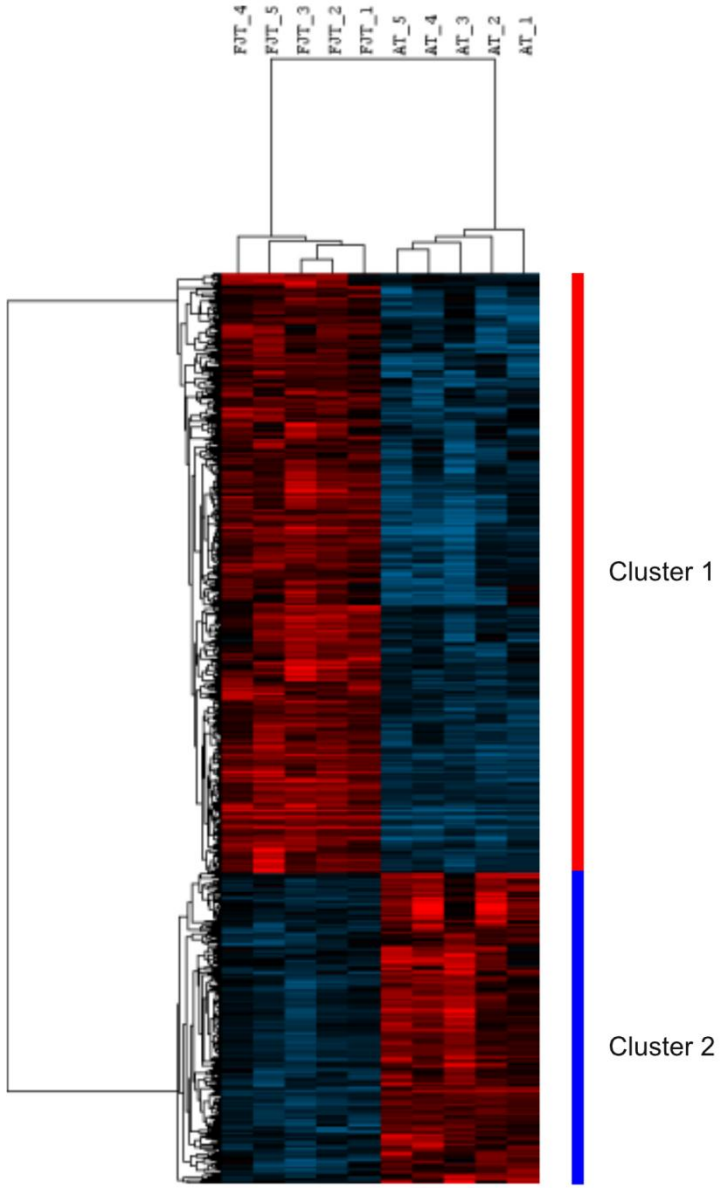

Figure 11 : Cluster hiérarchique des gènes différentiellement exprimés entre les précurseurs myogéniques FJT et les précurseurs myogéniques AT. Chaque ligne représente le profil d'expression d'un gène unique et chaque colonne correspond à un seul échantillon : colonnes 1 à 5 : précurseurs myogéniques FJT échantillonnés ; colonnes 6 à 10 : précurseurs myogéniques AT échantillonnés. Les niveaux d'expression sont représentés par des balises colorées, le rouge représentant les niveaux d'expression les plus élevés et le bleu les niveaux d'expression les plus bas.

2.2. Les précurseurs myogéniques provenant des truites juvéniles à jeun sur-expriment des gènes associés à la différenciation myogénique.

L'analyse d'enrichissement fonctionnel DAVID des 242 gènes éligibles (référencés dans DAVID) du Cluster 1 a révélé un enrichissement significatif (tableau 1) en gènes impliqués dans l'adhésion cellulaire (p value = 8,7.10-6), le développement du muscle (p value = 2,9 10-6), la différenciation musculaire (p value = 1,9 10-2) ainsi que dans l'organisation des projections cytoplasmiques (p value = 3,1 10-4). Parmi les catégories fonctionnelles inférées des gènes surexprimés chez les précurseurs myogéniques FJT, nous avons trouvé les GO termes ; myofibrille (p value = 1,1 10-4) et matrice extracellulaire (p value = 7,1 10-4).

Processus Biologique (GO)		Nombre de gènes	p-value
GO:0007155	cell adhesion	25	8,68E-06
GO:0007517	muscle organ development	14	2,94E-06
GO:0014706	striated muscle tissue development	9	1,37E-04
GO:0042692	muscle cell differentiation	6	0,019
GO:0031346	positive regulation of cell projection organization	6	3,12E-04
Composant Cellulaire (GO)		**Nombre de gènes**	**p-value**
GO:0030016	myofibril	9	1,15E-04
GO:0031012	extracellular matrix	14	7,08E-04

Tableau 1 : Catégories fonctionnelles déduites des gènes sous-exprimés dans les précurseurs myogéniques AT et surexprimés dans les précurseurs myogéniques FJT. Tableau des termes les plus significatifs de GO (Gene Ontology) dans la catégorie processus biologique et composant cellulaire qui ont été trouvés à la suite d'une analyse d'enrichissement fonctionnel (logiciel DAVID 6.7) parmi les gènes du Cluster 1.

De manière surprenante, l'analyse différentielle ne révèle pas d'enrichissement significatif en gènes impliqués dans le métabolisme. Ces résultats soulignent que le métabolisme des précurseurs myogéniques est équivalent pour les précurseurs myogéniques FJT et AT. Chez les mammifères, il a été montré que l'activité métabolique des cellules satellites quiescentes est réduite (Montarras *et al*., 2013), en accord avec l'activité mitochondriale restreinte des AT

et FJT déduite de l'analyse transcritomique des 3 conditions (chapitre 1). Cette activité métabolique faible et équivalente étaye l'idée d'un état quiescent des précurseurs myogéniques provenant de truites adultes et juvéniles à jeun.

Nos analyses d'enrichissement fonctionnel montrent, qu'après 24H en culture, les précurseurs myogéniques FJT, bien qu'en quiescence (chapitre 1), sur-expriment un nombre non négligeable de gènes associés à la myogenèse comparé aux précurseurs myogéniques AT. Ces résultats sont en cohérence avec les analyses *in vitro,* présentées dans la figure 12A et dans le chapitre 1. Ils révèlent que les précurseurs myogéniques AT ont de faibles capacités de différenciation tout au long de la culture cellulaire. En revanche, les précurseurs myogéniques FJT semblent présenter un démarrage de la différenciation après 11 jours en culture. Pour valider ce redémarrage de la différenciation, nous avons mesuré l'expression de MyoD (*myod1* et *myod2*) qui est un facteur de régulation myogénique précoce essentiel à la différenciation des précurseurs myogéniques (Rudnicki *et al*.; Cornelison *et al*., 2000; Berkes and Tapscott, 2005; de Almeida *et al*., 2010). Nos résultats de qPCR montrent clairement que, si l'expression des gènes codant *myod1* et *myod2* (figure 12B) augmente de manière significative entre J2 et J8 dans les précurseurs myogéniques FJT, il n'en va pas de même pour les précurseurs myogéniques AT. De plus, l'expression de *myogénine* et de *myomaker,* impliqués plus en aval dans le processus de différenciation, augmente entre J2 et J8 uniquement dans les précurseurs myogéniques FJT (Figure 7 Chapitre 1). L'ensemble de ces résultats attestent que les précurseurs myogéniques de truite juvénile à jeun bien que dans un état de quiescence, maintiennent une expression de gènes myogéniques, contrairement aux cellules issues de truites adultes, qui pourrait expliquer leur meilleure capacité myogénique *in vitro*.

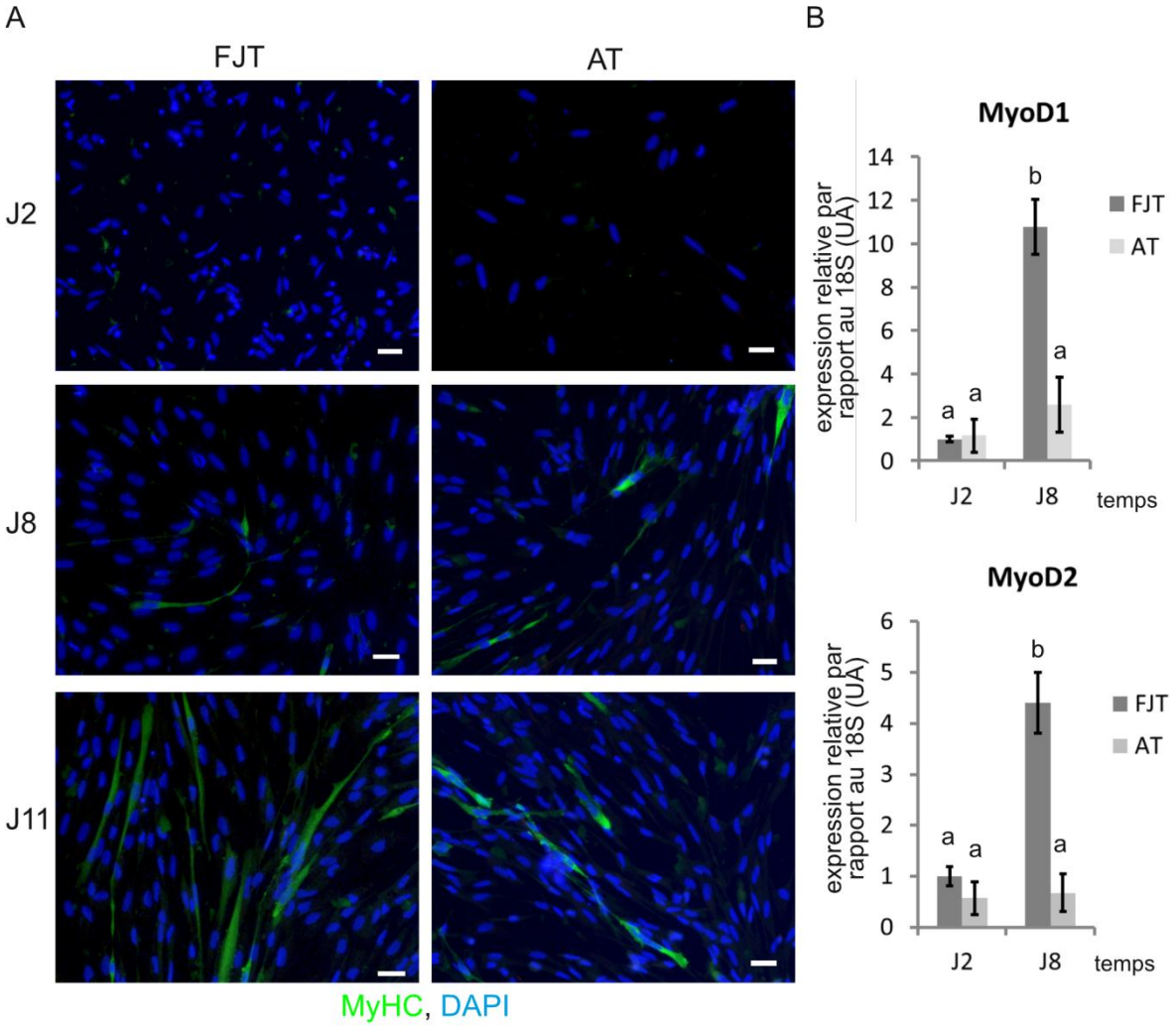

Figure 12 : Capacités de différenciation des précurseurs myogéniques FJT et AT en culture. A) Image représentant les précurseurs myogéniques FJT et AT après 2, 8 et 11 jours en culture, les cellules différenciées sont visualisées à l'aide d'un marquage anti-MyHC (vert). Les noyaux ont été contre-colorés avec DAPI (bleu) (barre d'échelle = 20µm). B) Quantification de l'expression de myod1 et myod2 dans les précurseurs myogéniques JT, FJT et AT. Chaque barre représente la moyenne (UA ±SD) de l'expression de myod1 et myod2 normalisée par la moyenne d'expression du gène codant 18S comme gène de référence pour chaque condition à J2 et J8. Des lettres différentes indiquent une différence significative entre les moyennes (ANOVA 2 voies suivi du test des comparaisons multiples de Tukey ; p-value ≤ 0,05 ; n ≥ 4).

2.3. Les précurseurs myogéniques extraits du muscle de la truite adulte sur-expriment les gènes liés au cycle cellulaire

L'analyse d'enrichissement fonctionnel DAVID des 143 gènes éligibles du Cluster 2 montre (tableau 2) un enrichissement significatif en gènes impliqués dans la mitose (p value = 2,0 10-8), le cycle cellulaire (p value = 2,4 10-6) et la ségrégation des chromosomes (p value = 6,7 10-5). Par exemple, les gènes codant la cycline B1 (*ccnb1*), la cycline dépendante kinase 1 (*cdk1*), la kinase aurora A (*aurka*) et l'homologue *cdc20* (également présenté dans la figure 13) sont surexprimés dans les précurseurs myogéniques AT comparés aux précurseurs myogéniques FJT. Ainsi, bien que le transcriptome des précurseurs myogénique AT signe clairement un état de quiescence (chapitre 1), la surexpression de gènes impliqués dans la division cellulaire est en cohérence avec les résultats d'analyse *in vitro* présentés dans le chapitre 1. Ces derniers indiquent, en effet, que la capacité de prolifération des précurseurs myogéniques AT est supérieure à celle des FJT.

Processus Biologique (GO)		Nombre de gènes	p-value
GO:0000279	M phase	17	2,00E-08
GO:0007067	mitosis	13	3,94E-07
GO:0007049	cell cycle	22	2,36E-06
GO:0007059	chromosome segregation	7	6,71E-05

Tableau 2 : Catégories fonctionnelles déduites des gènes sur exprimés dans les précurseurs myogéniques AT et sous exprimés dans les précurseurs myogéniques FJT. . Tableau des termes les plus significatifs de GO (Gene Ontology) dans la catégorie processus biologique qui ont été trouvés à la suite d'une analyse d'enrichissement fonctionnel (logiciel DAVID 6.7) parmi les gènes du Cluster 2.

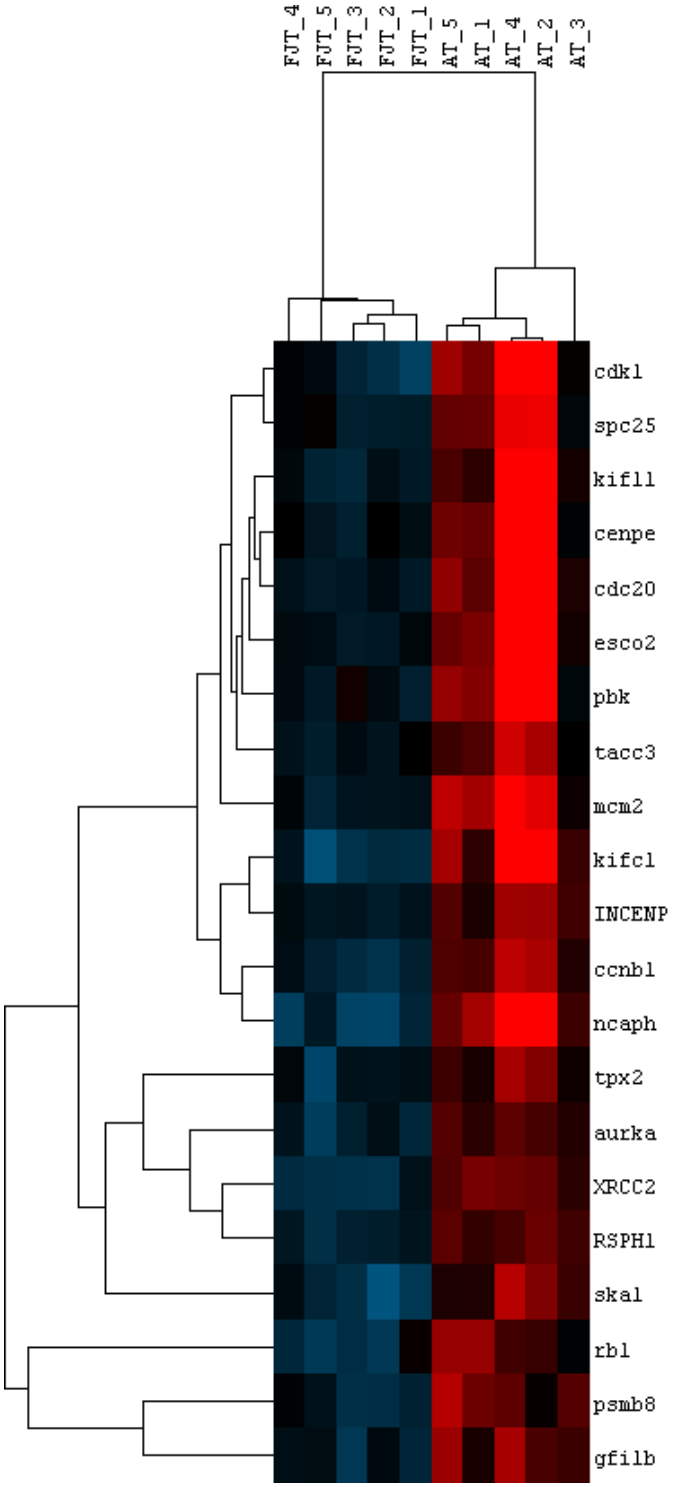

Figure 13 : Cluster hiérarchique des gènes du cycle cellulaire différentiellement exprimés entre les précurseurs myogéniques FJT et AT. Chaque ligne représente le profil d'expression d'un gène unique et chaque colonne correspond à un seul échantillon : colonnes 1 à 5 : précurseurs myogéniques FJT échantillonnés ; colonnes 6 à 10 : précurseurs myogéniques AT échantillonnés. Les niveaux d'expression sont représentés par des balises colorées, le rouge représentant les niveaux d'expression les plus élevés et le bleu les niveaux d'expression les plus bas

En conclusion, l'ensemble des résultats du chapitre 1 et de ce chapitre montent que les précurseurs myogéniques AT et FJT sont très similaires, et notamment du point de vue du métabolisme et de l'expression des marqueurs de quiescence, mais présentent des capacités de prolifération et de différenciation différentes.

Ainsi, malgré un métabolisme comparablement bas chez les précurseurs FJT et AT, les précurseurs myogéniques FJT expriment de nombreux gènes associés à la myogenèse, en cohérence avec leur capacité myogénique *in vitro* supérieure (chapitre 1). Réciproquement, la capacité de prolifération, plus forte, des précurseurs de muscle adulte (AT), observée *in vitro*, est associée à une surexpression de régulateurs du cycle cellulaire. Ainsi, l'analyse approfondie du transcriptome des précurseurs myogéniques quiescents de muscle adulte et juvénile à jeun permet d'expliquer les différences de comportement *in vitro*.

Chapitre 3 : Identification des miARN et des couples potentiels miARN-ARNm cible associés à l'état activé et quiescent des précurseurs myogéniques de la truite.

L'hyperplasie musculaire nécessite des cellules souches musculaires, aussi appelées cellules satellites (Mauro, 1961). Une fois activées pendant le développement, la croissance ou suite à une lésion musculaire, ces précurseurs myogéniques prolifèrent et se différencient pour former de nouvelles myofibres (Miller *et al*., 1998; Dumont *et al*, 2015a). Nous avons caractérisé, dans le premier chapitre, les propriétés intrinsèques des précurseurs myogéniques activés provenant de truites juvéniles en croissance hyperplasique. L'activation des précurseurs myogéniques est régulée par l'expression coordonnée de transcrits, qui peuvent être eux-mêmes régulés par des miARN (cf introduction bibliographique).

Les miARN sont de petits ARN non codants, régulant négativement l'expression des gènes au niveau post-transcriptionnel (Bartel, 2004). Les miARN sont reconnus et pris en charge par le complexe appelé RISC et se lient, le plus souvent, à la région non traduite 3′ (3′-UTR) de l'ARNm cible, induisant soit l'inhibition de la traduction des protéines, soit le clivage de l'ARNm (MacFarlane and Murphy, 2010b).

Chez les mammifères, de nombreux miARN sont exprimés dans le tissu musculaire. En raison de leur expression musculaire spécifique, les miARN miR-1, miR-133a, miR-133b et miR-206 sont aussi appelés myo-miRs. Leur expression est régulée par les MRF, tels que MyoD et la Myogénine, ainsi que par le facteur de réponse sérique (SRF) et MEF2 (Chen *et al*., 2005; Liu *et al*., 2007; Koutalianos *et al*., 2015). L'expression de certains de ces myo-miRs est induite pendant la différenciation des cellules musculaires, (Chen *et al*., 2005; Kim *et al*., 2006; Koutsoulidou *et al*., 2011), alors que d'autres, tels que miR-489, miR-195 et miR-497 (Cheung *et al*., 2012b; Sato *et al*., 2014), maintiennent les précurseurs myogéniques en quiescence.

Des analyses de génomique comparatives, sur plusieurs espèces de poissons, ont révélé que les régions du génome, où se trouvent les myo-miRs, sont fortement conservées au cours de l'évolution. Ceci suggère une conservation de leur fonction (Nachtigall *et al*., 2014). Chez les poissons, peu de données sont disponibles concernant le rôle des miARN dans la croissance musculaire ou la myogenèse. Chez le tilapia (*Oreochromis niloticus*) il a été montré, par exemple, que miR-206 freine la croissance musculaire en ciblant l'IGF-1 dans la région 3′-UTR de son messager (Yan *et al*., 2013).

L'objectif de ce chapitre est, dans un premier temps, d'identifier les miARN régulés dans les précurseurs myogéniques activés et quiescents de la truite, permettant ainsi de compléter les données expressionnelles présentées dans le chapitre 1. Dans un second temps, nous avons réalisé une méta-analyse entre les résultats du transcriptome et du miRnome, afin d'identifier de nouveaux couples miARN-ARNm cibles potentiellement impliqués dans l'activation ou la quiescence des précurseurs myogéniques de la truite. Récemment, un répertoire de miARN d'une grande variété de tissus a été publié permettant de réaliser des études haut débit (Juanchich *et al*., 2013). En utilisant ce répertoire, nous avons identifié, par une approche non dédiée, l'ensemble des miARN régulés différentiellement dans les précurseurs myogéniques extraits de truites juvéniles (JT), juvéniles à jeun (FJT) et de truites adultes (AT).

3.1. Matériels et méthodes

3.1.1. Animaux

Des truites arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) pesant entre 2g et 2kg ont été élevées à 12 h de lumière : 12 h de photopériode sombre à une température de 12 ± 1 °C dans un système d'eau recirculée, situé dans le Laboratoire de Physiologie et de Génomique des Poissons (LPGP). Les poissons étaient soit nourris tous les jours *ad libitum* avec un régime commercial, soit mis à jeun pendant 3 ou 4 semaines.

3.1.2. Isolement des précurseurs myogéniques de la truite

Pour toutes les études, les précurseurs myogéniques ont été isolés à partir de truites juvéniles (5g, JT), de truites juvéniles à jeun (5g, FJT) et de truites adultes (1,5-2kg, AT) comme décrit précédemment (Gabillard *et al*., 2010). Les précurseurs myogéniques, ainsi isolés, ont été ensemencés à raison de 80 000 cellules par cm^2.

3.1.3. Hybridation du microréseau de miARN et traitement des données

Les cellules ont été lysées via l'utilisation du Tri reagent (T9424, Sigma), l'ARN total a été extrait selon les instructions du fournisseur. Nous avons utilisé le microréseau décrit dans Juanchich *et al* (2013)(plate-forme GPL21776). Du fait de la très forte conservation des miARN chez les vertébrés, la plateforme a été conçue pour contenir 3800 miARN uniques de 13 espèces de vertébrés avec 16 oligo-sondes pour chaque miARN. 100 ng d'ARN total des cellules ont été déphosphorylé pendant 30 minutes à 37°C, puis dénaturés avec du diméthylsulfoxyde pendant 7 minutes à 100°C. L'ARN a été marqué par la cyanine 3-pCp en utilisant la ligase T4 pendant 2 h à 16°C. La purification a été effectuée à l'aide de colonnes Micro Bio-Spin afin d'éliminer la cyanine 3-pCp libre. L'ARN a ensuite été hybridé aux lames avec le Spike-In à 55°C, 20 rpm pendant 20 h. Les lames ont été lavées et immédiatement scannées à l'aide d'un scanner Agilent DNA Microarray Scanner (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). L'intensité du signal a été quantifiée à l'aide du logiciel Feature Extraction (Agilent v10.7.3.3.1). Les données ont alors été traitées à l'aide du logiciel GeneSpring

(Agilent v.11.5.0) en utilisant les valeurs de GmedianSignal. Enfin, les données ont été normalisées à l'aide de la méthode des quantiles.

3.1.4. Analyse statistique

Une analyse ANOVA avec correction de Benjamin-Hochberg a été effectuée pour détecter les miARN différentiellement exprimés du microréseau dans les trois conditions. Tous les échantillons ont été testés les uns par rapport aux autres, avec une *p-value* corrigée inférieure ou égale à 0.05. Pour l'analyse de clustering, les données ont été centrées sur la médiane et un regroupement hiérarchique non supervisé a été effectué à l'aide du logiciel CLUSTER, puis visualisé à l'aide de TREEVIEW. Sont considérés comme différentiels, les miARN pour lesquels au moins 50% des oligo-sondes correspondantes présentent une expression significativement différente dans au moins l'une des trois conditions.

3.1.5. Méta-analyses

Pour élargir la liste des cibles potentielles des miARN, nous avons ré analysé les données d'expression génique du chapitre 1 avec la même méthode mais avec une p-value corrigée plus élevée (P-val<0,01 contre P-val<0,001 dans le chapitre 1).

Les ARNm cibles sur le génome de la truite ont été prédits à l'aide de l'algorithme miRanda (score d'hybridation minimum : 170) pour les miARN candidats. Les ARNm cibles prédits ont été ensuite sélectionnés sur la base de leur profil d'expression issu des puces ARN (chapitre 1). Ainsi, seuls les ARNm cibles, dont le profil d'expression est inverse à celui du miARN testé et dont l'hybridation prédite se trouve dans la région 3'UTR, ont été sélectionnés.

3.2. Résultats-Discussion

3.2.1. L'analyse du miRnome montre trois signatures d'expressions spécifiques dans les précurseurs myogéniques extraits de truites juvéniles (JT), juvéniles à jeun (FJT) et adultes (AT).

L'analyse du microréseau nous a permis d'identifier 101 miARN différentiellement exprimés, dans au moins une condition, chez les précurseurs myogéniques provenant de truite juvéniles (JT), juvéniles à jeun (FJT) et adultes (AT). Le clustering hiérarchique, présenté dans la figure 14, permet de visualiser 3 clusters principaux : le cluster 1 (38 miARN uniques) correspond aux miARN surexprimés dans les précurseurs myogéniques provenant de muscle en croissance hyperplasique (JT) comparés aux précurseurs myogéniques provenant de muscle non-hyperplasique (FJT et AT). Le cluster 2 (25 miARN uniques) correspond aux miARN surexprimés dans les précurseurs myogéniques provenant de truites juvéniles (JT et FJT) comparés aux précurseurs myogéniques provenant de truites adultes (AT). Et, le cluster 3 (39 miARN uniques) correspond aux miARN surexprimés dans les précurseurs myogéniques extraits de muscle non-hyperplasique (FJT et AT) comparés aux précurseurs myogéniques JT provenant de muscles en croissance hyperplasique. Ainsi, les précurseurs myogéniques extraits des 3 conditions (JT, FJT et AT) ont une signature expressionnelle des miARN qui leur est spécifique.

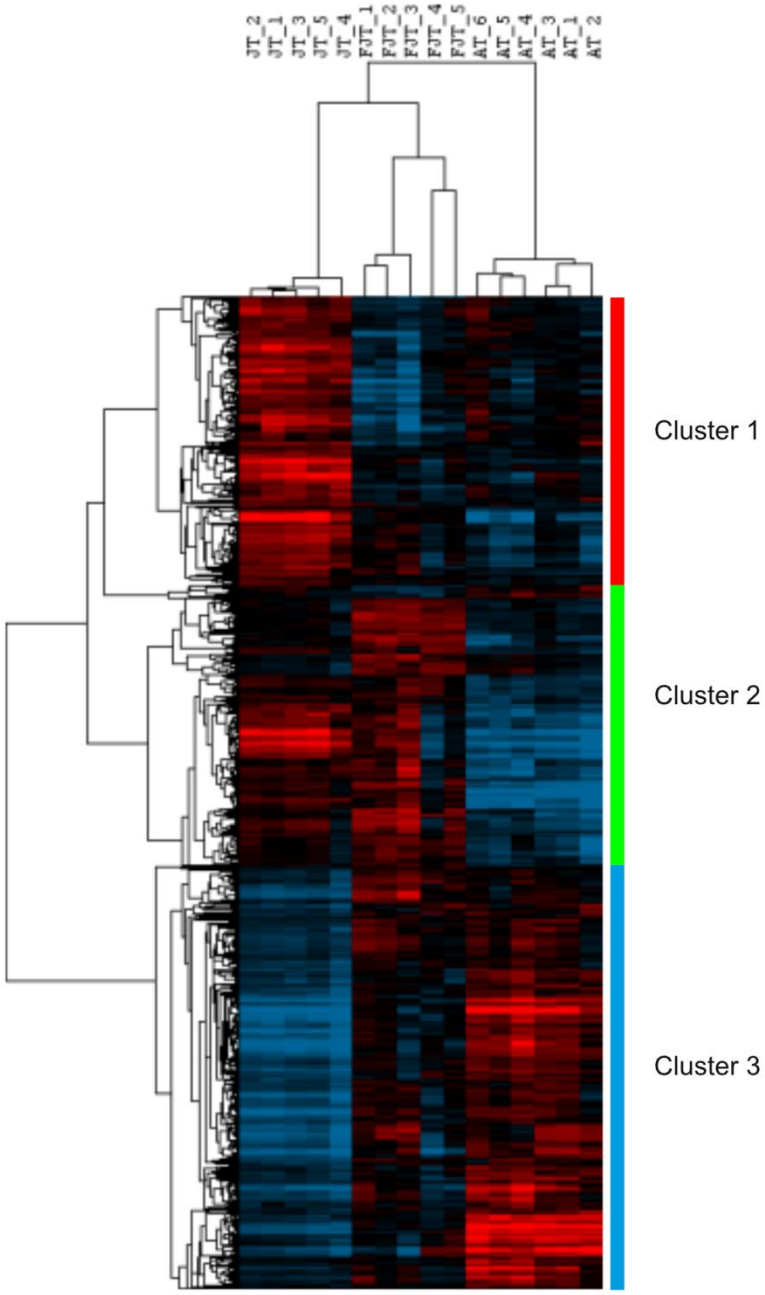

Figure 14 : Regroupement hiérarchique des miARN exprimés de façon différentielle dans les précurseurs myogéniques JT, FJT et AT. Chaque ligne représente le profil d'expression des miARN et chaque colonne correspond à un seul échantillon JT (colonnes de 1 à 5), FJT (colonnes de 6 à 10) et AT (colonnes de 11 à 17). Les niveaux d'expression sont représentés par des couleurs différentes, le rouge indiquant les niveaux d'expression les plus élevés et le bleu les plus bas.

3.2.2. Les précurseurs myogéniques issus de muscle hyperplasique sur-expriment des miARN spécifiques de l'état activé

Parmi les miARN composant le cluster 1 (tableau 3), nous avons noté un enrichissement en miARN connus pour être impliqués dans la différenciation myogénique et la prolifération des précurseurs myogéniques tels que miR-206, miR-29, miR-181, miR-221, miR-222 et miR-106 (Kim *et al*., 2006; Naguibneva *et al*., 2006; Cardinali *et al*., 2009; Eisenberg *et al*., 2009; Dey *et al*., 2011; Wei *et al*., 2013; Koutalianos *et al*., 2015; Mok *et al*., 2017).

Parmi les miARN du cluster 1 nous trouvons le miR-181b qui est également surexprimé dans les précurseurs myogéniques différenciés de la truite après restauration de la méthionine dans le milieu de culture (Latimer *et al*., 2017). Le miR-142-3p est également surexprimé dans les précurseurs myogéniques JT comparés aux précurseurs myogéniques FJT et AT. Or, le *knock-down* de miR-142-3p induit des défauts dans la somitogenèse chez le poisson zèbre, se traduisant par des défauts d'alignements des fibres musculaires notamment (Nishiyama *et al*., 2012). Par ailleurs, parmi les miARN du cluster 1 on trouve miR-17 et miR-20 précédemment décrits comme fortement exprimés dans les myoblastes en prolifération et inhibant la différenciation chez les mammifères (Tang *et al*., 2017).

D'une manière générale, on observe au sein du cluster 1 des miARN exprimés dans des précurseurs myogéniques activés, connus pour réguler soit la prolifération, soit la différenciation. Ainsi, le profil d'expression de ces miRNAs est cohérent avec les résultats du chapitre 1, montrant un état activé des précurseurs myogéniques provenant de muscle hyperplasique (JT).

Cluster1		Cluster2		Cluster3	
miR-106	miR-29d	let-7d-5p	miR-301c-3p	let-7a-5p	miR-192-5p
miR-1207-5p	miR-3162-5p	miR-103	miR-454-3p	let-7b-5p	miR-215-5p
miR-1233-5p	miR-324-3p	miR-107	miR-93	let-7c	miR-2188-5p
miR-1260a	miR-4286	miR-10b-5p	miR-99a-5p	let-7e	miR-22a-3p
miR-142-3p	miR-4299	miR-130b-3p		let-7f-5p	miR-23a-3p
miR-17-5p	miR-4443	miR-130b-5p		let-7g	miR-24b-3p
miR-17a-5p	miR-4721	miR-130c-3p		let-7k-5p	miR-25-3p
miR-181b-5p	miR-494-3p	miR-133b		miR-100-5p	miR-26a-5p
miR-1897-3p	miR-5100	miR-1-3p		miR-101a-3p	miR-26b-5p
miR-193a-3p	miR-5109	miR-16-5p		miR-101b	miR-30a-3p
miR-197-5p	miR-5739	miR-18a		miR-10a-5p	miR-30a-5p
miR-19a-3p	miR-6165	miR-196a-5p		miR-10c-5p	miR-30c-5p
miR-19b-3p	miR-6243	miR-199a-3p		miR-126-5p	miR-30e-3p
miR-205-5p	miR-6368	miR-199a-5p		miR-126a-3p	miR-338-3p
miR-206	miR-652-5p	miR-199b-5p		miR-126b-3p	miR-365a-3p
miR-20a-5p	miR-939-5p	miR-214-3p		miR-139-5p	miR-451a
miR-20b-5p		miR-218a		miR-143-3p	miR-462
miR-21		miR-223-3p		miR-145-5p	miR-99
miR-221-3p		miR-23b-3p		miR-150-5p	
miR-222a-3p		miR-27b-3p		miR-15a	
miR-290		miR-301a-3p		miR-181a	

Tableau 3 : miARN différentiellement exprimés et présents dans l'un des trois clusters identifiés par l'analyse de clustering.

3.2.3. Une signature expressionnelle des miARN spécifique liée à l'âge de l'animal.

Le clustering des miARN nous a permis de mettre en lumière un groupe de miARN (cluster 2), surexprimés dans les précurseurs myogéniques extraits d'animaux juvéniles (JT et FJT) comparés aux précurseurs myogéniques provenant de truites adultes (AT). Ce cluster 2 regroupe des miARN impliqués dans la régulation de la différenciation myogénique, tels que miR-1, miR-133b, miR-27b, miR-103, miR-16 et miR-214-3p (Flynt *et al*., 2007; Juan *et al*., 2009; Mishima *et al*., 2009; Dmitriev *et al*., 2013; Lozano-Velasco *et al*., 2015). Notons que, parmi les miARN composant ce cluster 2, miR10b et 196 ont un profil d'expression légèrement différent. En effet, ces miARN sont surexprimés dans les précurseurs myogéniques FJT comparés aux précurseurs myogéniques JT et AT. Ceci suggère une régulation de l'expression de ces miARN liée au jeûne. En cohérence avec les résultats décrits dans le chapitre 2, qui montrent un enrichissement en gènes associés à la

myogenèse dans les précurseurs myogéniques FJT comparés aux AT, l'analyse du cluster 2 montre que les précurseurs myogéniques issus d'animaux juvéniles partagent une expression commune d'un grand nombre de miARN, pour partie, associée à la différenciation myogénique.

3.2.4. Les miARN connus pour être impliqués dans l'inhibition de la différenciation myogénique sont surexprimés dans les précurseurs myogéniques extraits de muscle non-hyperplasique de truite

Le troisième groupe de miARN, dont les profils d'expressions sont similaires (cluster 3), regroupe les miARN surexprimés dans les précurseurs myogéniques AT et FJT comparés aux précurseurs myogéniques JT. Comme nous pouvions nous y attendre, le cluster 3 regroupe un certain de nombre de miARN (tableau 3) impliqués dans l'inhibition de la différenciation des précurseurs myogéniques, comme miR-139-5p, miR-192, miR-30, miR-101, miR-126 et miR-143 (Mi *et al*., 2014; Li *et al*., 2015; Zhang *et al*., 2016; Zhao *et al*., 2016; Xu *et al*., 2018). Plus précisément, miR-101 et miR-126 sont connus pour réprimer l'expression des facteurs de régulation myogéniques, tels que Myf5, MyoD ou la Myogenine (Rivas *et al*., 2014; Wu *et al*., 2017). Au sein du cluster 3, nous avons également identifié des miARN fortement exprimés dans les précurseurs AT appartenant aux familles de miARN let-7, miR-126, miR-100, miR-22, miR-23a et miR-30. Ces observations sont en accord avec les données de la littérature, puisque l'expression de ces familles de miARN augmente avec l'âge dans les précurseurs myogéniques et/ou dans le muscle chez les mamifères (Sato *et al*., 2014; Jun-Hao *et al*., 2016). L'ensemble de ces résultats suggèrent ainsi une signature forte de répression des voies de différenciation par les miRNAs, dans les précurseurs myogéniques issus de muscle non-hyperplasique.

Pour conclure, l'ensemble de nos résultats sur le miRnome des précurseurs myogéniques des trois conditions sont en cohérence avec l'ensemble des analyses décrites dans les précédents chapitres. En effet, les précurseurs myogéniques issus de muscle hyperplasiques (JT) sur-expriment les miARN associés à un état activé, caractérisé dans le chapitre 1, comparés aux précurseurs myogéniques issus de muscle non-hyperplasique (FJT et AT). Étonnamment, dans les précurseurs myogéniques nous pouvons constater une signature expressionnelle d'un grand nombre de miARN liée à l'âge : juvénile *versus* adulte. Ainsi, l'analyse du miRnome permet de préciser et d'appréhender, plus finement, les propriétés intrinsèques de nos précurseurs myogéniques.

3.2.5. Identification de couples miARN-ARNm cible potentiellement impliqués dans l'activation et la quiescence des précurseurs myogéniques chez la truite.

L'analyse transcriptomique avec un seuil du FDR (gestion des faux positifs) augmenté à 1%, a révélé 5308 gènes différentiellement exprimés entre les précurseurs myogéniques issus de muscle hyperplasique (JT) comparés aux précurseurs myogéniques issus de muscle non-hyperplasique (FJT et AT).

Les cibles potentielles des miARN ont été prédites avec l'algorithme miRanda, en utilisant la dernière annotation du génome de la truite (GCF_002163495.1). Ensuite, seules les cibles potentielles, dont le profil d'expression était inverse à celui du miARN testé, ont été sélectionnées. A l'aide de cette stratégie, 178 couples miARN-ARNm cible ont été trouvés (figure 15), avec 1 à 9 cibles potentielles par miARN.

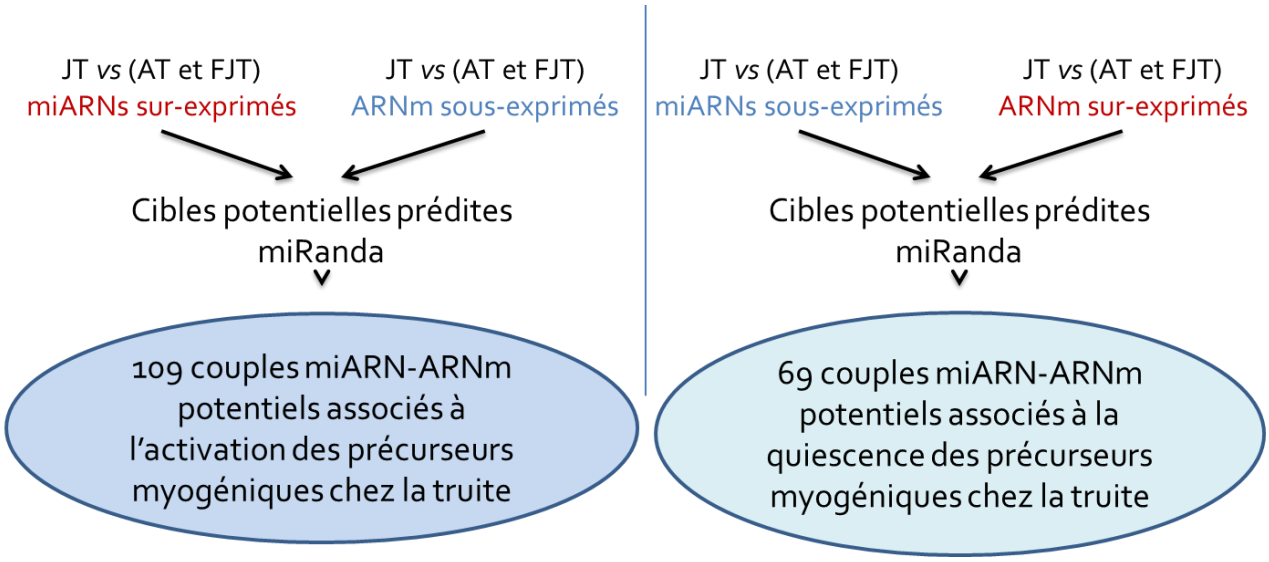

Figure 15 : Stratégie utilisée pour la prédiction in silico des cibles des miARN par l'utilisation des données du transcriptome et du miRnome.

Parmi ceux-ci, 109 couples miARN-ARNm cible correspondent à des miARN (36 uniques) surexprimés (cluster 1) et des gènes (73 uniques) sous exprimés dans les précurseurs myogéniques JT comparés aux précurseurs myogéniques AT et FJT. Ces couples sont donc associés à des précurseurs myogéniques dans un état activé (tableau 4).

Les 69 autres couples miARN-ARNm cible correspondent à des miARN (24 uniques) sous-exprimés (cluster 3) et des gènes (48 uniques) surexprimés dans les précurseurs myogéniques JT comparés aux précurseurs myogéniques AT et FJT. Ces couples sont donc associés à la quiescence des précurseurs myogéniques (tableau 5).

Ainsi, à la lumière de leur profil d'expression, parmi ces couples miARN-ARNm cible associés à l'état d'activation, nous trouvons le miR-6165, et une de ses cibles, le gène *ski-like protein.* Le miR-6165 est surexprimé dans les précurseurs myogéniques provenant de muscle en croissance hyperplasique (JT), alors que *ski* est faiblement exprimé dans ces conditions. Or, il a été montré, d'une part, que l'expression de *ski* est plus faible chez les souris jeunes et, d'autre part, que la surexpression du transgène codant une protéine *ski* tronquée induit une hypertrophie des fibres musculaires (Sutrave *et al.*, 1990; Leferovich *et al.*, 1995; Chargé *et al.*, 2002). Ces résultats

suggèrent que le couple miR-6165/ski serait fonctionnel chez la truite et régulerait l'hypertrophie des fibres.

Parmi les couples miARN-ARNm cible potentiellement impliqués dans la quiescence nous trouvons le miR-101a-3p et l'une de ses cibles potentielles est *follistatin-related protein 1-like*. Le miR-101a-3p est surexprimé dans les précurseurs myogéniques provenant de muscle non-hyperplasique (AT et FJT) et il a été montré que mir-101 est un inhibiteur de la différenciation dans les C2C12. Il inhibe l'expression de MyoD et de la Myogénine (Wu *et al*., 2017). Nos analyses, *in silico*, révèlent que *follistatin-related protein 1-like* pourrait être une cible de mir-101a-3p. Nous avons observé que son expression est sous-exprimée dans les précurseurs myogéniques provenant de muscle non-hyperplasique (AT et FJT). La Follistatine like 1 (fstl1) est une glycoprotéine sécrétée, de la famille de la Follistatine, connue pour favoriser le développement musculaire en bloquant l'action de la myostatin, un puissant inhibiteur de la croissance musculaire (Lee and McPherron, 2001; Hill *et al*., 2002; Amthor *et al*., 2004). La fonction de *fstl1,* dans la physiologie du muscle, est peu connue. Cependant, une étude récente a montré que l'expression de fstl1 est induite, après ajout dans le milieu de culture de cytokines pro-inflammatoires, et augmente avec la différenciation dans les myoblastes humains (Görgens *et al*., 2013). De plus, la surexpression de la *follistatin related protein 1-like,* chez la perche, induirait l'activation des précurseurs myogéniques, une augmentation de l'hyperplasie et serait associée à une diminution de l'expression de la myostatine (W. Chu *et al*., 2016). L'expression du miR-101a-3p pourrait, de ce fait, inhiber l'expression de la *follistatine-related protein 1-like* chez la truite, et avoir ainsi un effet inhibiteur sur l'activation des précurseurs myogéniques et sur la croissance musculaire.

Dès lors, la méta-analyse a permis d'identifier de nouveaux couples potentiels miARN-ARNm cible associés à l'état activé et de quiescence des précurseurs myogéniques chez la truite. Des analyses complémentaires seront nécessaires pour confirmer le rôle de ces nouvelles voies de régulation.

MiARN	ARNm	Nom
miR-106	XM_021578732.1	SOSS complex subunit B2-like
	XM_021586030.1	IST1 homolog
	XM_021586212.1	unconventional myosin-Ie-like
	XM_021591342.1	probable palmitoyltransferase ZDHHC20
	XM_021610152.1	serine/threonine-protein phosphatase 6 regulatory ankyrin repeat subunit C-like
	XM_021612966.1	cAMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase 4D-like
	XM_021615925.1	ALAS2
miR-1207-5p	XM_021580222.1	cortactin-binding protein 2-like
miR-130c-3p	XM_021561466.1	lamp2
	XM_021563431.1	regulator of nonsense transcripts 2
	XM_021580961.1	angiopoietin-2 like
	XM_021584315.1	endoplasmic reticulum oxidoreductase 1 alpha
	XM_021607951.1	CPEB1 cytoplasmic polyadenylation element binding protein 1
	XM_021610152.1	serine/threonine-protein phosphatase 6 regulatory ankyrin repeat subunit C-like
	XM_021619788.1	teneurin-2-like
miR-133b	XM_021591126.1	apelin receptor B-like
miR-1-3p	XM_021582198.1	cdc42 effector protein 2-like
	XM_021591464.1	RAS guanyl-releasing protein 2-like
	XM_021604415.1	bromodomain testis-specific protein-like
	XM_021613083.1	xenotropic and polytropic retrovirus receptor 1 homolog
miR-142-3p	XM_021559976.1	tissue factor pathway inhibitor 2
miR-17-5p	XM_021591342.1	probable palmitoyltransferase ZDHHC20
	XM_021612966.1	cAMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase 4D-like
	XM_021615925.1	ALAS2
miR-17a-5p	XM_021591342.1	probable palmitoyltransferase ZDHHC20
	XM_021612966.1	cAMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase 4D-like
	XM_021615925.1	ALAS2

Tableau 4 : Couples miARN-ARNm cible prédits via miRanda et potentiellement associés à l'activation des précurseurs myogéniques. L'ensemble des miARN surexprimés dans les précurseurs myogéniques JT comparés aux précurseurs myogéniques AT et FJT identifiés par l'analyse différentielle des données du microréseau et leurs messagers cibles potentiels sous exprimés dans les précurseurs myogéniques JT, comparés aux précurseurs myogéniques AT et FJT.

MiARN	ARNm	Nom
miR-181b-5p	XM_021617905.1	rab GTPase-binding effector protein 1-like
miR-18a	XM_021563674.1	optineurin-like
	XM_021613772.1	E3 ubiquitin-protein ligase znrf1-like
	XM_021623544.1	ribosomal protein S6 kinase beta-1-like
miR-18b-5p	XM_021563674.1	optineurin-like
	XM_021613772.1	E3 ubiquitin-protein ligase znrf1-like
	XM_021623544.1	ribosomal protein S6 kinase beta-1-like
miR-197-5p	XM_021560287.1	AT-rich interactive domain-containing protein 1A-like
	XM_021561466.1	lamp2
	XM_021577147.1	transmembrane and coiled-coil domains protein 3-like
	XM_021624107.1	serine/threonine-protein kinase 10-like
miR-199a-5p	XM_021563731.1	podocalyxin-like
	XM_021568307.1	A-kinase anchor protein 13-like
miR-19a-3p	XM_021567255.1	IQ motif and SEC7 domain-containing protein 2-like
	XM_021621521.1	uncharacterized
miR-19b-3p	XM_021566289.1	pleckstrin homology domain-containing family A member 7-like
	XM_021567255.1	IQ motif and SEC7 domain-containing protein 2-like
miR-205-5p	XM_021616802.1	protein Wnt-10b-like
miR-206	XM_021580961.1	angiopoietin-2 like
	XM_021582198.1	cdc42 effector protein 2-like
	XM_021604415.1	bromodomain testis-specific protein-like
miR-20a-5p	XM_021578732.1	SOSS complex subunit B2-like
	XM_021586030.1	IST1 homolog
	XM_021586212.1	unconventional myosin-Ie-like
	XM_021591342.1	probable palmitoyltransferase ZDHHC20
	XM_021612966.1	cAMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase 4D-like
	XM_021615925.1	ALAS2
miR-20b-5p	XM_021591342.1	probable palmitoyltransferase ZDHHC20
	XM_021612966.1	cAMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase 4D-like
	XM_021615925.1	ALAS2
	XM_021586030.1	IST1 homolog

Tableau 4 (suite) : Couples miARN-ARNm cible prédits via miRanda et potentiellement associés à l'activation des précurseurs myogéniques. L'ensemble des miARN surexprimés dans les précurseurs myogéniques JT comparés aux précurseurs myogéniques AT et FJT identifiés par l'analyse différentielle des données du microréseau et leurs messagers cibles potentiels sous exprimés dans les précurseurs myogéniques JT, comparés aux précurseurs myogéniques AT et FJT.

MiARN	ARNm	Nom
miR-21	XM_021598723.1	protein FAM60A-like
	XM_021609504.1	zinc fingers and homeoboxes protein 3-like
	XM_021623167.1	nuclear fragile X mental retardation-interacting protein 2-like
miR-214-3p	XM_021576033.1	vesicle-fusing ATPase
	XM_021600083.1	zinc transporter 1-like
	XM_021621521.1	uncharacterized
	XM_021623167.1	nuclear fragile X mental retardation-interacting protein 2-like
miR-214-5p	XM_021624779.1	gap junction gamma-1 protein-like
miR-221-3p	XM_021559976.1	tissue factor pathway inhibitor 2
	XM_021578614.1	tbc1d4 TBC1 domain family member 4
	XM_021623334.1	cohesin subunit SA-2-like
miR-29d	XM_021594774.1	protein C-ets-1-like
	XM_021611391.1	proto-oncogene c-Fos-like
	XM_021624205.1	PWWP domain-containing protein 2A-like
miR-301a-3p	XM_021571876.1	splicing factor, proline- and glutamine-rich-like
	XM_021584315.1	endoplasmic reticulum oxidoreductase 1 alpha
	XM_021587352.1	histone-lysine N-methyltransferase 2A-like
	XM_021597335.1	enhancer of polycomb homolog 2
	XM_021597598.1	mediator of RNA polymerase II transcription subunit 4
	XM_021603870.1	guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-11
	XM_021566289.1	pleckstrin homology domain-containing family A member 7-like
	XM_021613991.1	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor 2-like
	XM_021623133.1	PHD finger protein 12-like
miR-301c-3p	XM_021572559.1	family with sequence similarity 221 member A
	XM_021584315.1	endoplasmic reticulum oxidoreductase 1 alpha
	XM_021597335.1	enhancer of polycomb homolog 2
	XM_021622700.1	integrin alpha-2-like
miR-3162-5p	NM_001171853.1	cytokine inducible SH2-containing protein
	XM_021573473.1	F-box only protein 8-like
	XM_021582195.1	zinc finger CCCH domain-containing protein 4-like
	XM_021590141.1	deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase SAMHD1-like

Tableau 4 (suite) : Couples miARN-ARNm cible prédits via miRanda et potentiellement associés à l'activation des précurseurs myogéniques. L'ensemble des miARN surexprimés dans les précurseurs myogéniques JT comparés aux précurseurs myogéniques AT et FJT identifiés par l'analyse différentielle des données du microréseau et leurs messagers cibles potentiels sous exprimés dans les précurseurs myogéniques JT, comparés aux précurseurs myogéniques AT et FJT.

MiARN	ARNm	Nom
miR-4299	XM_021586467.1	transcription factor SOX-6-like
miR-4721	XM_021624793.1	serine/threonine-protein kinase tousled-like 2
miR-494-3p	XM_021556180.1	dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 7-like
miR-5100	XM_021598481.1	adhesion G-protein coupled receptor F2-like
	XM_021603140.1	tyrosine-protein kinase SgK223-like
miR-6165	XM_021590168.1	ski-like protein
	XM_021620877.1	mitogen-activated protein kinase 4-like
miR-6368	XM_021556979.1	phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 5
	XM_021565900.1	protein lifeguard 2-like
	XM_021566792.1	qrich1 glutamine rich 1
	XM_021580222.1	cortactin-binding protein 2-like
	XM_021607395.1	E3 ubiquitin-protein ligase NEDD4-like
miR-652-5p	XM_021625038.1	maternal B9.15 protein-like
miR-93	XM_021568450.1	Slc12a5
	XM_021569144.1	nr1d1
	XM_021578732.1	SOSS complex subunit B2-like
	XM_021615925.1	ALAS2
	XM_021621767.1	PIP5K1B
miR-939-5p	XM_021575585.1	protein shisa-6 homolog
	XM_021611391.1	proto-oncogene c-Fos-like

Tableau 4 (suite) : Couples miARN-ARNm cible prédits via miRanda et potentiellement associés à l'activation des précurseurs myogéniques. L'ensemble des miARN surexprimés dans les précurseurs myogéniques JT comparés aux précurseurs myogéniques AT et FJT identifiés par l'analyse différentielle des données du microréseau et leurs messagers cibles potentiels sous exprimés dans les précurseurs myogéniques JT, comparés aux précurseurs myogéniques AT et FJT.

MiARN	ARNm	Nom
let-7a	XM_021590277.1	inhibitor of growth protein 4-like
let-7b	XM_021567019.1	protein NDRG3-like
	XM_021573553.1	thioredoxin-related transmembrane protein 2-B
let-7c	XM_021567019.1	protein NDRG3-like
	XM_021590277.1	inhibitor of growth protein 4-like
let-7e	XM_021590277.1	inhibitor of growth protein 4-like
let-7f-5p	XM_021590277.1	inhibitor of growth protein 4-like
let-7g	XM_021590277.1	inhibitor of growth protein 4-like
let-7k-5p	XM_021574479.1	zfyve19 zinc finger FYVE-type containing 19
	XM_021589004.1	GTP-binding protein REM 2-like
miR-101a-3p	XM_021619967.1	pold2 DNA polymerase delta 2, accessory subunit
	XM_021583468.1	hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase
	XM_021619967.1	DNA polymerase delta 2, accessory subunit
	XM_021623724.1	B-cell CLL/lymphoma 7 protein family member B-A-like
	XM_021571467.1	follistatin-related protein 1-like
	XM_021606465.1	ELMO domain-containing protein 3-like
	XM_021608722.1	gamma-aminobutyric acid receptor subunit gamma-3-like
miR-101b	XM_021606465.1	ELMO domain-containing protein 3-like
	XM_021606642.1	rnf215 ring finger protein 215
	XM_021611622.1	ribonucleoside-diphosphate reductase subunit M2
	XM_021619967.1	pold2 DNA polymerase delta 2, accessory subunit
	XM_021623724.1	B-cell CLL/lymphoma 7 protein family member B-A-like
miR-139	NM_001165197.1	beta-ureidopropionase 1
	XM_021566072.1	ceramide-1-phosphate transfer protein-like
	XM_021579370.1	mannosyl-oligosaccharide 1,2-alpha-mannosidase IB-like
	XM_021583240.1	transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3-like
	XM_021597814.1	nuclear transport factor 2
	XM_021599483.1	regulator of G-protein signaling 21-like
	XM_021618378.1	oligophrenin-1-like
miR-143-3p	XM_021579180.1	protein Wnt-10a
	XM_021621420.1	BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3-like
miR-15a	XM_021579180.1	protein Wnt-10a
	XM_021579370.1	mannosyl-oligosaccharide 1,2-alpha-mannosidase IB-like
	XM_021617902.1	proteasome assembly chaperone 1
	XM_021573844.1	mbip MAP3K12 binding inhibitory protein 1
	XM_021579370.1	mannosyl-oligosaccharide 1,2-alpha-mannosidase IB-like

Tableau 5 : Couples miARN-ARNm cible prédits via miRanda et potentiellement associés à la quiescence des précurseurs myogéniques. L'ensemble des miARN sous-exprimés dans les précurseurs myogéniques JT comparés aux précurseurs myogéniques AT et FJT identifiés par l'analyse différentielle des données du microréseau et leurs messagers cibles potentiels surexprimés dans les précurseurs myogéniques JT, comparés aux précurseurs myogéniques AT et FJT

MiARN	ARNm	Nom
miR-181a	XM_021563544.1	dedicator of cytokinesis protein 4-like
	XM_021607334.1	lysine--tRNA ligase-like
miR-192-5p	XM_021556793.1	coiled-coil domain-containing protein 151-like
	XM_021610059.1	homeobox protein Hox-C12a-like
miR-215-5p	XM_021556793.1	coiled-coil domain-containing protein 151-like
	XM_021610059.1	homeobox protein Hox-C12a-like
miR-22	XM_021604322.1	beta-sarcoglycan-like
miR-22a-3p	XM_021586406.1	AP-2 complex subunit alpha-2
	XM_021604322.1	beta-sarcoglycan-like
miR-23a-3p	NM_001165089.1	Replication protein A 14 kDa subunit
	XM_021583699.1	zinc finger protein 69-like
	XM_021585928.1	UPF0547 protein C16orf87 homolog
miR-25-3p	XM_021580228.1	opsin-3-like
	XM_021590259.1	mediator of RNA polymerase II transcription subunit 13-like
	XM_021596339.1	NADP-dependent malic enzyme-like
	XM_021622796.1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0-like
miR-26a-5p	XM_021569596.1	WAP four-disulfide core domain protein 1-like
miR-26b	XM_021569596.1	WAP four-disulfide core domain protein 1-like
	XM_021571491.1	alpha-1,6-mannosylglycoprotein 6-beta-N-acetylglucosaminyltransferase A-like
	XM_021572649.1	collagen type I alpha 2 chain
miR-30a-3p	NM_001160513.1	Josephin-2
	NM_001165128.1	actin related protein 2/3 complex inhibitor (arpin)
	XM_021569304.1	prefoldin subunit 5
	XM_021573741.1	putative deoxyribonuclease TATDN3
	XM_021601824.1	dpm2 dolichyl-phosphate mannosyltransferase subunit 2, regulatory
miR-30c-5p	XM_021559950.1	GATA zinc finger domain-containing protein 1-like
	XM_021597956.1	NXPE family member 3-like
miR-30e-3p	NM_001160513.1	Josephin-2
	NM_001165128.1	actin related protein 2/3 complex inhibitor (arpin)
	XM_021560031.1	DENN domain-containing protein 3-like
	XM_021571491.1	alpha-1,6-mannosylglycoprotein 6-beta-N-acetylglucosaminyltransferase A-like
	XM_021573741.1	putative deoxyribonuclease TATDN3
	XM_021601824.1	dpm2 dolichyl-phosphate mannosyltransferase subunit 2, regulatory

Tableau 5 (suite) : Couples miARN-ARNm cible prédits via miRanda et potentiellement associés à la quiescence des précurseurs myogéniques. L'ensemble des miARN sous-exprimés dans les précurseurs myogéniques JT comparés aux précurseurs myogéniques AT et FJT identifiés par l'analyse différentielle des données du microréseau et leurs messagers cibles potentiels surexprimés dans les précurseurs myogéniques JT, comparés aux précurseurs myogéniques AT et FJT

Discussion Générale

Chez la plupart des téléostéens comme la truite, il y a persistance d'une hyperplasie musculaire au cours de la croissance post-larvaire. L'hyperplasie nécessite la prolifération, la différenciation et la fusion des cellules satellites pour former de nouvelles fibres plurinucléées. Dans ce travail, nous avons caractérisé finement les précurseurs myogéniques du muscle hyperplasique, et montré que la persistance de l'hyperplasie était associée à des propriétés intrinsèques particulières.

Nos résultats ont clairement mis en évidence un taux plus élevé de cellules prolifératives en position satellitaire dans le muscle hyperplasique, par rapport à celui du muscle non-hyperplasique. Nous avons montré que les précurseurs myogéniques du muscle hyperplasique sur-expriment les gènes ainsi que les miARN associés à la myogenèse et la prolifération (chapitre 1 et 3). Ces résultats, en accord avec le taux de prolifération et de différenciation de ces cellules mesuré *in vitro*, confirment l'hypothèse selon laquelle **les cellules satellites du muscle hyperplasique de la truite sont dans un état activé**. Cet état activé, chez les juvéniles, dépend de l'apport nutritionnel puisque nous montrons que la mise à jeun induit un état de quiescence de ces cellules. L'état activé intrinsèque des précurseurs myogéniques extraits des poissons juvéniles, pourrait-il être la résultante de l'activité métabolique et/ou de marques épigénétiques ? Plusieurs résultats semblent aller en ce sens. En effet, l'analyse du transcriptome (chapitre 1) a mis en évidence des enrichissements en gènes, impliqués dans le métabolisme énergétique et protéique, déduits des gènes sur exprimés dans les précurseurs JT, comparés aux précurseurs FJT et AT. Or, l'activation de ces voies métaboliques est connue pour réguler la sortie de l'état de quiescence des cellules satellites (Wagatsuma and Sakuma, 2013; Pietrosemoli *et al*., 2017). Cette analyse révèle également une sur expression de nombreux gènes, impliqués dans la méthylation de l'ADN dans les précurseurs myogéniques JT, notamment plusieurs ADN méthyltransférases (dnmt1, 3ab et 3b), connus pour être impliqués dans l'activation des cellules souches musculaires (Laker and Ryall, 2016). De plus, nous montrons une sur expression, dans les précurseurs myogéniques JT, de nombreuses enzymes de remodelage de la chromatine SWI/SNF, dont le recrutement régule de nombreux stades de la myogenèse (Toto *et al*., 2016).

Par opposition, le transcriptome des précurseurs myogéniques des muscles non-hyperplasiques (FJT et AT), comparé à celui des précurseurs myogéniques JT, a révélé une surexpression des gènes impliqués dans le maintien de la quiescence des cellules souches. Parmi ces gènes, il a notamment

été observé ceux impliqués dans la signalisation Notch (Mourikis *et al*., 2012) ou ceux connus comme marqueurs de la cellule souche quiescente du muscle. Ces résultats sont en accord avec les données obtenues chez la souris, présentant une surexpression des gènes notch et Hey dans les cellules satellites quiescentes (Fukada *et al*., 2007). De plus, la surexpression de plusieurs gènes et miARN, impliqués par exemple dans la voie TGFbeta, suggère une répression de la différenciation des précurseurs myogéniques (Liu *et al*., 2001). Toutes ces données montrent que les précurseurs myogéniques, extraits du muscle de la truite à jeun ou de la truite adulte, sont proches de l'état quiescent. De plus, ces résultats indiquent aussi qu'un arrêt de croissance hyperplasique s'accompagne d'une mise en quiescence des précurseurs myogéniques.

Cependant, les analyses *in vitro* montrent des capacités de prolifération et de différenciation différentes entre les précurseurs myogéniques quiescents issus de truites adultes, et ceux issus de truites juvéniles à jeun.

La mise à jeun induit un arrêt de croissance (Gabillard *et al*., 2006) se traduisant par une inhibition de la prolifération des cellules satellitaires *in situ (chapitre 1)*. Les capacités de prolifération des précurseurs myogéniques sont fortement inhibées tout au long de la culture, en cohérence avec un état quiescent de ces cellules. L'ensemble de nos résultats montrent un arrêt du programme myogénique qui perdure pendant au moins 8 jours en culture. Pourtant, l'analyse du transciptome (chapitre 2), du miRnome (chapitre 3) et l'augmentation de l'expression des facteurs de régulation myogéniques (*myogénine*, *myoD*) après 8 jours en culture (Chapitre 1 et 2) suggèrent que les précurseurs myogéniques de truites juvéniles à jeun conservent une potentialité myogénique. En effet, entre 8 et 11 jours en culture, un facteur 12 marque l'augmentation du taux de différenciation. De nouvelles analyses, dédiées à la caractérisation de l'état de quiescence induite par le jeûne, permettraient de définir les voies moléculaires requises et d'identifier les acteurs potentiels de cette « potentialité myogénique ».

Nos résultats montrent une faible capacité de différenciation *in vitro* des précurseurs myogéniques adultes (AT) alors qu'ils ont une capacité de prolifération comparable aux précurseurs myogéniques des juvéniles (JT). Les caractéristiques cellulaires et moléculaires des précurseurs myogéniques de la

truite adulte observées sont-elles suffisantes pour assurer le processus de croissance continue caractéristique de ces animaux ? De nouvelles analyses sur les propriétés cellulaires et moléculaires des précurseurs myogéniques d'animaux, à différents stades adultes, permettraient ; (i) de déterminer si un redémarrage de la prolifération et/ou de la différenciation s'effectue, (ii) d'établir s'il y a lieu de corréler, des cycles d'activation/quiescence des précurseurs myogéniques aux périodes de croissance/reproduction.

Bien que les précurseurs du muscle adulte présentent de faibles capacités de différenciation *in vitro*, il a été montré que lors de la régénération musculaire, de nouvelles fibres sont formées (Rescan *et al*., 2015). En effet, la présence de petites fibres, au niveau du site lésionnel, a été observée après 30 jours. Toutefois, ces travaux n'ont pu montrer de manière formelle une régénération complète du muscle adulte chez la truite (Montfort *et al*., 2016). De plus, les images histologiques présentent une accumulation de tissu conjonctif, au niveau du site lésionnel après 30 jours. Ainsi, la faible capacité de différenciation des précurseurs myogéniques de la truite adulte ne permettrait qu'une faible capacité régénérative du muscle adulte. On peut également émettre l'hypothèse selon laquelle les précurseurs myogéniques adultes expriment une plus forte capacité de différenciation, uniquement dans le cadre de la régénération musculaire. Pour tester cette hypothèse, du TNFα et de l'IL1β pourraient être ajoutés dans le milieu de culture afin de mimer les signaux de l'inflammation, correspondant à la première phase de la régénération (Karalaki *et al*., 2009; Kamizaki *et al*., 2017). L'évaluation des capacités de différenciation, en réponse aux signaux de l'inflammation des précurseurs myogéniques AT en culture, donnerait ainsi des éléments de réponse permettant de valider ou d'invalider cette hypothèse.

Pour expliquer la faible capacité myogénique des précurseurs adultes, le rôle prépondérant du microenvironnement sur l'état des cellules souches musculaires ne peut être exclu. Les signaux provenant de la niche sont connus pour influer sur l'état d'activation ou de quiescence des cellules souches musculaires chez les mammifères (Morrison and Spradling; Bentzinger *et al*., 2013; Aradhya *et al*., 2015). Il est donc envisageable que des changements de la niche satellitaire, entre le muscle en croissance hyperplasique juvénile et le muscle non-hyperplasique adulte, influent sur les propriétés observées des précurseurs myogéniques de la truite. Afin d'évaluer l'influence de la niche sur les propriétés fonctionnelles de ces cellules, les capacités à former de nouvelles fibres des précurseurs myogéniques JT (exprimant la GFP), après transplantation dans le muscle adulte (et inversement), seront prochainement étudiées au laboratoire.

En conclusion, chez les poissons à croissance continue comme la truite, le processus de croissance hyperplasique est exacerbé puisque, au moment de la maturation sexuelle, le nombre de fibres est 150 fois plus important qu'à l'éclosion (Stickland, 1983). Nous avons ainsi démontré, pour la première fois, l'association de l'activation des précurseurs myogéniques à la croissance hyperplasique de la truite. Par ailleurs, le processus de croissance hypertrophique est, lui aussi, extrêmement important. Le diamètre moyen des fibres du muscle blanc de la truite atteint, en effet, environ 160 µm au moment de la maturation, alors qu'à l'éclosion il est de 20 à 40 µm (Rowe and Goldspink, 1969; Stickland, 1983; Johnston *et al*., 1999). Comme il l'a été montré, l'hypertrophie des fibres chez le saumon s'accompagne d'une augmentation du nombre de noyaux dans les fibres (Johnston *et al*., 2003b). On peut donc supposer que la présence de précurseurs myogéniques activés est essentielle à l'exacerbation de l'hyperplasie et de l'hypertrophie. De plus, le diamètre moyen des fibres musculaires est un facteur de texture. L'hyperplasie influe sur le diamètre moyen des fibres (Stickland, 1983). Outre son implication dans la croissance en général, l'hyperplasie est donc un facteur déterminant de la texture de la chair (dureté/tendreté). Sa maîtrise constitue alors un levier d'action possible dans le contrôle de la qualité. L'ensemble des résultats présentés permet de mieux comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires associés aux propriétés intrinsèques des précurseurs myogéniques, et d'obtenir une liste de marqueurs potentiels de la croissance musculaire, dans sa composante hyperplasique, chez les poissons. Dans un enjeu agronomique, l'identification de ces marqueurs potentiels de la croissance hyperplasique permettrait, à terme, de maîtriser la croissance et certains paramètres de qualité, telle que la texture de la chair. L'identification des voies moléculaires et cellulaires, impliquées dans le maintien de l'activation des précurseurs myogéniques ainsi que l'évolution de ces propriétés avec l'âge, dans un modèle animal de croissance continue, pourrait, par ailleurs, offrir de nouvelles perspectives en médecine régénérative.

Références

Abou-Khalil, R., Le Grand, F., Pallafacchina, G., Valable, S., Authier, F.-J., Rudnicki, M.A., Gherardi, R.K., Germain, S., Chretien, F., Sotiropoulos, A., et al. (2009). Autocrine and Paracrine Angiopoietin 1/Tie-2 Signaling Promotes Muscle Satellite Cell Self-Renewal. Cell Stem Cell *5*, 298–309.

De Almeida, F.L.A., Pessotti, N.S., Pinhal, D., Padovani, C.R., Leitão, N. de J., Carvalho, R.F., Martins, C., Portella, M.C., and Dal Pai-Silva, M. (2010). Quantitative expression of myogenic regulatory factors MyoD and myogenin in pacu (Piaractus mesopotamicus) skeletal muscle during growth. Micron *41*, 997–1004.

Amthor, H., Nicholas, G., McKinnell, I., Kemp, C.F., Sharma, M., Kambadur, R., and Patel, K. (2004). Follistatin complexes Myostatin and antagonises Myostatin-mediated inhibition of myogenesis. Developmental Biology *270*, 19–30.

De Angelis, L., Berghella, L., Coletta, M., Lattanzi, L., Zanchi, M., Gabriella, M., Ponzetto, C., and Cossu, G. (1999). Skeletal Myogenic Progenitors Originating from Embryonic Dorsal Aorta Coexpress Endothelial and Myogenic Markers and Contribute to Postnatal Muscle Growth and Regeneration. The Journal of Cell Biology *147*, 869–878.

Aradhya, R., Zmojdzian, M., Da Ponte, J.P., and Jagla, K. (2015). Muscle niche-driven Insulin-Notch-Myc cascade reactivates dormant Adult Muscle Precursors in Drosophila. eLife Sciences.

Armand, O., Boutineau, A., Mauger, A., Pautou, M., and Kieny, M. (1983). Origin of satellite cells in avian skeletal muscles. Archives d'anatomie microscopique et de morphologie experimentale *72*, 163–181.

Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. Cell *116*, 281–297.

Bentzinger, C.F., Wang, Y.X., Dumont, N.A., and Rudnicki, M.A. (2013). Cellular dynamics in the muscle satellite cell niche. EMBO Reports *14*, 1062–1072.

Berberoglu, M.A., Gallagher, T.L., Morrow, Z.T., Talbot, J.C., Hromowyk, K.J., Tenente, I.M., Langenau, D.M., and Amacher, S.L. (2017). Satellite-like cells contribute to pax7-dependent skeletal muscle repair in adult zebrafish. Developmental Biology *424*, 162–180.

Berkes, C.A., and Tapscott, S.J. (2005). MyoD and the transcriptional control of myogenesis. Seminars in Cell & Developmental Biology *16*,.

Bernet, J.D., Doles, J.D., Hall, J.K., Kelly-Tanaka, K., Carter, T.A., and Olwin, B.B. (2014). P38 MAPK signaling underlies a cell autonomous loss of stem cell self-renewal in aged skeletal muscle. Nature Medicine *20*, 265–271.

Bigot, A., Duddy, W.J., Ouandaogo, Z.G., Negroni, E., Mariot, V., Ghimbovschi, S., Harmon, B., Wielgosik, A., Loiseau, C., Devaney, J., et al. (2015). Age-Associated Methylation Suppresses SPRY1, Leading to a Failure of Re-quiescence and Loss of the Reserve Stem Cell Pool in Elderly Muscle. Cell Reports *13*, 1172–1182.

Biressi, S., Molinaro, M., and Cossu, G. (2007). Cellular heterogeneity during vertebrate skeletal muscle development. Developmental Biology *308*, 281–293.

Bischoff, R. and Heintz, C. (1994). Enhancement of skeletal muscle regeneration. Developmental Dynamics *201*, 41–54.

Bonnet, M., Louveau, I., Cassar-Malek, I., Lefaucheur, L., and 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.

Boonsanay, V., Zhang, T., Georgieva, A., Kostin, S., Qi, H., Yuan, X., Zhou, Y., and Braun, T. (2016). Regulation of Skeletal Muscle Stem Cell Quiescence by Suv4-20h1-Dependent Facultative Heterochromatin Formation. Cell Stem Cell *18*, 229–242.

Bower, N.I., and Johnston, I.A. (2009). Selection of reference genes for expression studies with fish myogenic cell cultures. BMC Molecular Biology *10*, 80–80.

Brodeur, J.C., Calvo, J., and Johnston, I.A. (2003). Proliferation of myogenic progenitor cells following feeding in the sub-antarctic notothenioid fish Harpagifer bispinis. J. Exp. Biol. *206*, 163.

Brohl, D., Vasyutina, E., Czajkowski, M.T., Griger, J., Rassek, C., Rahn, H.-P., Purfürst, B., Wende, H., and Birchmeier, C. (2012). Colonization of the Satellite Cell Niche by Skeletal Muscle Progenitor Cells Depends on Notch Signals. Developmental Cell *23*, 469–481.

Buckingham, M. (2006). Myogenic progenitor cells and skeletal myogenesis in vertebrates. Current Opinion in Genetics & Development *16*, 525–532.

Buckingham, M., Bajard, L., Chang, T., Daubas, P., Hadchouel, J., Meilhac, S., Montarras, D., Rocancourt, D., and Relaix, F. (2003). The formation of skeletal muscle: from somite to limb. Journal of Anatomy *202*, 59–68.

Cantini, M., Giurisato, E., Radu, C., Tiozzo, S., Pampinella, F., Senigaglia, D., Zaniolo, G., Mazzoleni, F., and Vitiello, L. (2002). Macrophage-secreted myogenic factors: a promising tool for greatly enhancing the proliferative capacity of myoblasts in vitro and in vivo. Neurological Sciences *23*, 189–194.

Cardinali, B., Castellani, L., Fasanaro, P., Basso, A., Alemà, S., Martelli, F., and Falcone, G. (2009). Microrna-221 and Microrna-222 Modulate Differentiation and Maturation of Skeletal Muscle Cells. PLOS ONE *4*, e7607.

Chargé, S.B.P., Brack, A.S., and Hughes, S.M. (2002). Aging-related satellite cell differentiation defect occurs prematurely after Ski-induced muscle hypertrophy. American Journal of Physiology-Cell Physiology *283*, C1228–C1241.

Chen, J.-F., Mandel, E.M., Thomson, J.M., Wu, Q., Callis, T.E., Hammond, S.M., Conlon, F.L., and Wang, D.-Z. (2005). The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. Nature Genetics *38*, 228.

Cheung, T.H., Quach, N.L., Charville, G.W., Liu, L., Park, L., Edalati, A., Yoo, B., Hoang, P., and Rando, T.A. (2012). Maintenance of muscle stem cell quiescence by microRNA-489. Nature *482*, 524–528.

Chung, J.Y., Lu, M., Yin, Q., Lin, S.-C., and Wu, H. (2007). Molecular Basis for the Unique Specificity of TRAF6. In TNF Receptor Associated Factors (TRAFs), H. Wu, ed. (New York, NY: Springer New York), pp. 122–130.

Collins, C.A., Olsen, I., Zammit, P.S., Heslop, L., Petrie, A., Partridge, T.A., and Morgan, J.E. (2005). Stem Cell Function, Self-Renewal, and Behavioral Heterogeneity of Cells from the Adult Muscle Satellite Cell Niche. Cell *122*, 289–301.

Collins-Hooper, H., Woolley, T.E., Dyson, L., Patel, A., Potter, P., Baker, R.E., Gaffney, E.A., Maini, P.K., Dash, P.R., and Patel, K. (2012). Age-Related Changes in Speed and Mechanism of Adult Skeletal Muscle Stem Cell Migration. STEM CELLS *30*, 1182–1195.

Conboy, I.M., and Rando, T.A. (2002). The Regulation of Notch Signaling Controls Satellite Cell Activation and Cell Fate Determination in Postnatal Myogenesis. Developmental Cell *3*, 397–409.

Conerly, M.L., Yao, Z., Zhong, J.W., Groudine, M., and Tapscott, S.J. (2016). Distinct Activities of Myf5 and MyoD Indicate Separate Roles in Skeletal Muscle Lineage Specification and Differentiation. Developmental Cell *36*, 375–385.

Cooper, R.N., Tajbakhsh, S., Mouly, V., Cossu, G., Buckingham, M., and Butler-Browne, G.S. (1999). In vivo satellite cell activation via Myf5 and MyoD in regenerating mouse skeletal muscle. J. Cell Sci. *112*, 2895.

Cornelison, D.D.W., Olwin, B.B., Rudnicki, M.A., and Wold, B.J. (2000). MyoD−/− Satellite Cells in Single-Fiber Culture Are Differentiation Defective and MRF4 Deficient. Developmental Biology *224*, 122–137.

Cornelison, D.D.W., and Wold, B.J. (1997). Single-Cell Analysis of Regulatory Gene Expression in Quiescent and Activated Mouse Skeletal Muscle Satellite Cells. Developmental Biology *191*, 270–283.

Cosgrove, B.D., Gilbert, P.M., Porpiglia, E., Mourkioti, F., Lee, S.P., Corbel, S.Y., Llewellyn, M.E., Delp, S.L., and Blau, H.M. (2014). Rejuvenation of the muscle stem cell population restores strength to injured aged muscles. Nature Medicine *20*, 255.

Cosgrove, B.D., Sacco, A., Gilbert, P.M., and Blau, H.M. (2009). A home away from home: challenges and opportunities in engineering in vitro muscle satellite cell niches. Differentiation; Research in Biological Diversity *78*, 185–194.

Crist, C.G., Montarras, D., Pallafacchina, G., Rocancourt, D., Cumano, A., Conway, S.J., and Buckingham, M. (2009). Muscle stem cell behavior is modified by microRNA-27 regulation of Pax3 expression. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *106*, 13383–13387.

Dellavalle, A., Maroli, G., Covarello, D., Azzoni, E., Innocenzi, A., Perani, L., Antonini, S., Sambasivan, R., Brunelli, S., Tajbakhsh, S., et al. (2011). Pericytes resident in postnatal skeletal muscle differentiate into muscle fibres and generate satellite cells. Nature Communications *2*, 499.

Devoto, S., Stoiber, W., Hammond, C., Steinbacher, P., Haslett, J., Barresi, M., Patterson, S., Adiarte, E., and Hughes, S. (2006). Generality of vertebrate developmental patterns: evidence for a dermomyotome in fish. Evolution & Development *8*, 101–110.

Devoto, S.H., Melancon, E., Eisen, J.S., and Westerfield, M. (1996). Identification of separate slow and fast muscle precursor cells in vivo, prior to somite formation. Development *122*, 3371.

Dey, B.K., Gagan, J., and Dutta, A. (2011). miR-206 and -486 Induce Myoblast Differentiation by Downregulating Pax7. Molecular and Cellular Biology *31*, 203–214.

Dmitriev, P., Barat, A., Polesskaya, A., O'Connell, M.J., Robert, T., Dessen, P., Walsh, T.A., Lazar, V., Turki, A., Carnac, G., et al. (2013). Simultaneous miRNA and mRNA transcriptome profiling of human myoblasts reveals a novel set of myogenic differentiation-associated miRNAs and their target genes. BMC Genomics *14*, 265–265.

Dumont, N.A., Wang, Y.X. and Rudnicki, M.A. (2015a). Intrinsic and extrinsic mechanisms regulating satellite cell function. Development *142*, 1572–1581.

Dumont, N.A., Wang, Y.X., Von Maltzahn, J., Pasut, A., Bentzinger, C.F., Brun, C.E., and Rudnicki, M.A. (2015b). Dystrophin expression in muscle stem cells regulates their polarity and asymmetric division. Nature Medicine.

Egner, I.M., Bruusgaard, J.C., and Gundersen, K. (2016). Satellite cell depletion prevents fiber hypertrophy in skeletal muscle. Development *143*, 2898.

Egner, I.M., Bruusgaard, J.C., and Gundersen, K. (2017). An apparent lack of effect of satellite cell depletion on hypertrophy could be due to methodological limitations. Response to "Methodological issues limit interpretation of negative effects of satellite cell depletion on adult muscle hypertrophy". Development *144*, 1365.

Eisenberg, I., Alexander, M.S., and Kunkel, L.M. (2009). miRNAS in normal and diseased skeletal muscle. Journal of Cellular and Molecular Medicine *13*, 2–11.

Esner, M., Meilhac, S.M., Relaix, F., Nicolas, J.-F., Cossu, G., and Buckingham, M.E. (2006). Smooth muscle of the dorsal aorta shares a common clonal origin with skeletal muscle of the myotome. Development *133*, 737.

Fauconneau, B., and Paboeuf, G. (2000). Effect of fasting and refeeding on in vitro muscle cell proliferation in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Cell and Tissue Research *301*, 459–463.

Feng, Y., Niu, L.-L., Wei, W., Zhang, W.-Y., Li, X.-Y., Cao, J.-H., and Zhao, S.-H. (2013). A feedback circuit between miR-133 and the ERK1/2 pathway involving an exquisite mechanism for regulating myoblast proliferation and differentiation. Cell Death & Disease *4*, e934.

Flynt, A.S., Li, N., Thatcher, E.J., Solnica-Krezel, L., and Patton, J.G. (2007). Zebrafish miR-214 modulates Hedgehog signaling to specify muscle cell fate. Nature Genetics *39*, 259–263.

Fukada, S., Uezumi, A., Ikemoto, M., Masuda, S., Segawa, M., Tanimura, N., Yamamoto, H., Miyagoe-Suzuki, Y., and Takeda, S. (2007). Molecular Signature of Quiescent Satellite Cells in Adult Skeletal Muscle. STEM CELLS *25*, 2448–2459.

Gabillard, J., Sabin, N., and Paboeuf, G. (2010). In vitro characterization of proliferation and differentiation of trout satellite cells. Cell Tissue Res *342*, 471–477.

Gabillard, J.C., Kamangar, B.B., and Montserrat, N. (2006). Coordinated regulation of the GH/IGF system genes during refeeding in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). J Endocrinol *191*,.

Gardan, D., Gondret, F., and Louveau, I. (2006). Lipid metabolism and secretory function of porcine intramuscular adipocytes compared with subcutaneous and perirenal adipocytes. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism *291*, E372–E380.

Goh, Q., and Millay, D.P. (2017). Requirement of myomaker-mediated stem cell fusion for skeletal muscle hypertrophy. eLife *6*, e20007.

Görgens, S.W., Raschke, S., Holven, K.B., Jensen, J., Eckardt, K., and Eckel, J. (2013). Regulation of follistatin-like protein 1 expression and secretion in primary human skeletal muscle cells. Archives of Physiology and Biochemistry *119*, 75–80.

Greenlee A. R., Dodson M. V., Yablonka-Reuveni Z., Kersten C. A., and Cloud J. G. (1995). In vitro differentiation of myoblasts from skeletal muscle of rainbow trout. Journal of Fish Biology *46*, 731–747.

Grobet, L., Royo Martin, L.J., Poncelet, D., Pirottin, D., Brouwers, B., Riquet, J., Schoeberlein, A., Dunner, S., Ménissier, F., Massabanda, J., et al. (1997). A deletion in the bovine myostatin gene causes the double–muscled phenotype in cattle. Nature Genetics *17*, 71.

Gros, J., Manceau, M., Thomé, V., and Marcelle, C. (2005). A common somitic origin for embryonic muscle progenitors and satellite cells. Nature *435*, 954.

Guerci, A., Lahoute, C., Hébrard, S., Collard, L., Graindorge, D., Favier, M., Cagnard, N., Batonnet-Pichon, S., Précigout, G., Garcia, L., et al. (2012). Srf-Dependent Paracrine Signals Produced by Myofibers Control Satellite Cell-Mediated Skeletal Muscle Hypertrophy. Cell Metabolism *15*, 25–37.

Gurevich, D.B., Nguyen, P.D., Siegel, A.L., Ehrlich, O.V., Sonntag, C., Phan, J.M.N., Berger, S., Ratnayake, D., Hersey, L., Berger, J., et al. (2016). Asymmetric division of clonal muscle stem cells coordinates muscle regeneration in vivo. Science *353*,.

Hausburg, M.A., Doles, J.D., Clement, S.L., Cadwallader, A.B., Hall, M.N., Blackshear, P.J., Lykke-Andersen, J., and Olwin, B.B. (2015). Post-transcriptional regulation of satellite cell quiescence by TTP-mediated mRNA decay. eLife *4*, e03390.

Hayashiji, N., Yuasa, S., Miyagoe-Suzuki, Y., Hara, M., Ito, N., Hashimoto, H., Kusumoto, D., Seki, T., Tohyama, S., Kodaira, M., et al. (2015). G-CSF supports long-term muscle regeneration in mouse models of muscular dystrophy. Nature Communications *6*, 6745.

Hill, J.J., Davies, M.V., Pearson, A.A., Wang, J.H., Hewick, R.M., Wolfman, N.M., and Qiu, Y. (2002). The Myostatin Propeptide and the Follistatin-related Gene Are Inhibitory Binding Proteins of Myostatin in Normal Serum. Journal of Biological Chemistry *277*, 40735–40741.

Hindi, S.M., and Kumar, A. (2016). TRAF6 regulates satellite stem cell self-renewal and function during regenerative myogenesis. The Journal of Clinical Investigation *126*, 151–168.

Hollway, G.E., Bryson-Richardson, R.J., Berger, S., Cole, N.J., Hall, T.E., and Currie, P.D. (2007). Whole-Somite Rotation Generates Muscle Progenitor Cell Compartments in the Developing Zebrafish Embryo. Developmental Cell *12*, 207–219.

Hutcheson, D.A., Zhao, J., Merrell, A., Haldar, M., and Kardon, G. (2009). Embryonic and fetal limb myogenic cells are derived from developmentally distinct progenitors and have different requirements for β-catenin. Genes & Development *23*, 997–1013.

Iso, T., Kedes, L., and Hamamori, Y. (2003). HES and HERP families: Multiple effectors of the notch signaling pathway. Journal of Cellular Physiology *194*, 237–255.

Johnston, I.A., Bower, N.I., and Macqueen, D.J. (2011). Growth and the regulation of myotomal muscle mass in teleost fish. J. Exp. Biol. *214*, 1617.

Johnston, I.A., Lee, H.-T., Macqueen, D.J., Paranthaman, K., Kawashima, C., Anwar, A., Kinghorn, J.R., and Dalmay, T. (2009). Embryonic temperature affects muscle fibre recruitment in adult zebrafish: genome-wide changes in gene and microRNA expression associated with the transition from hyperplastic to hypertrophic growth phenotypes. J. Exp. Biol. *212*, 1781.

Johnston, I.A., Manthri, S., Alderson, R., Smart, A., Campbell, P., Nickell, D., Robertson, B., Paxton, C.G.M., and Burt, M.L. (2003a). Freshwater environment affects growth rate and muscle fibre recruitment in seawater stages of Atlantic salmon (Salmo salar L. J Exp Biol *206*,.

Johnston, I.A., Manthri, S., Smart, A., Campbell, P., Nickell, D., and Alderson, R. (2003b). Plasticity of muscle fibre number in seawater stages of Atlantic salmon in response to photoperiod manipulation. J. Exp. Biol. *206*, 3425.

Johnston, I.A., Strugnell, G., McCracken, M.L., and Johnstone, R. (1999). Muscle growth and development in normal-sex-ratio and all-female diploid and triploid Atlantic salmon. J. Exp. Biol. *202*, 1991.

Jones, A.E., Price, F.D., Le Grand, F., Soleimani, V.D., Dick, S.A., Megeney, L.A., and Rudnicki, M.A. (2015). Wnt/β-catenin controls follistatin signalling to regulate satellite cell myogenic potential. Skeletal Muscle *5*, 14.

Juan, A.H., Kumar, R.M., Marx, J.G., Young, R.A., and Sartorelli, V. (2009). Mir-214-Dependent Regulation of the Polycomb Protein Ezh2 in Skeletal Muscle and Embryonic Stem Cells. Molecular Cell *36*, 61–74.

Juanchich, A., Le Cam, A., Montfort, J., Guiguen, Y., and Bobe, J. (2013). Identification of Differentially Expressed miRNAs and Their Potential Targets During Fish Ovarian Development. Biology of Reproduction *88*, 128, 1–11.

Jun-Hao, E.T., Gupta, R.R., and Shyh-Chang, N. (2016). Lin28 and let-7 in the Metabolic Physiology of Aging. Trends in Endocrinology & Metabolism *27*, 132–141.

Kamizaki, K., Doi, R., Hayashi, M., Saji, T., Kanagawa, M., Toda, T., Fukada, S., Ho, H.-Y.H., Greenberg, M.E., Endo, M., et al. (2017). The Ror1 receptor tyrosine kinase plays a critical role in regulating satellite cell proliferation during regeneration of injured muscle. Journal of Biological Chemistry *292*, 15939–15951.

Karalaki, M., Fili, S., Philippou, A., and Koutsilieris, M. (2009). Muscle Regeneration: Cellular and Molecular Events. In Vivo *23*, 779–796.

Kassar-Duchossoy, L., Giacone, E., Gayraud-Morel, B., Jory, A., Gomès, D., and Tajbakhsh, S. (2005). Pax3/Pax7 mark a novel population of primitive myogenic cells during development. Genes & Development *19*, 1426–1431.

Kim, H.K., Lee, Y.S., Sivaprasad, U., Malhotra, A., and Dutta, A. (2006). Muscle-specific microRNA miR-206 promotes muscle differentiation. The Journal of Cell Biology *174*, 677–687.

Kitzmann, M., Carnac, G., Vandromme, M., Primig, M., Lamb, N.J., and Fernandez, A. (1998). The Muscle Regulatory Factors MyoD and Myf-5 Undergo Distinct Cell Cycle–specific Expression in Muscle Cells. The Journal of Cell Biology *142*, 1447–1459.

Kobielak, A., and Fuchs, E. (2004). α-CATENIN: AT THE JUNCTION OF INTERCELLULAR ADHESION AND ACTIN DYNAMICS. Nature Reviews. Molecular Cell Biology *5*, 614–625.

Koumans, J.T.M., and Akster, H.A. (1995). Myogenic cells in development and growth of fish. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology *110*, 3–20.

Koumans, J.T.M., Akster, H.A., Booms, G.H.R., and Osse, J.W.M. (1993a). Growth of carp (Cyprinus carpio) white axial muscle; hyperplasia and hypertrophy in relation to the myonucleus/sarcoplasm ratio and the occurrence of different subclasses of myogenic cells. Journal of Fish Biology *43*, 69–80.

Koumans, J.T.M., Akster, H.A., Booms, R.G.H., and Osse, J.W.M. (1993b). Influence of fish size on proliferation and differentiation of cultured myosatellite cells of white axial muscle of carp (Cyprinus carpio L.). Differentiation *53*, 1–6.

Koutalianos, D., Koutsoulidou, A., Mastroyiannopoulos, N.P., Furling, D., and Phylactou, L.A. (2015). MyoD transcription factor induces myogenesis by inhibiting Twist-1 through miR-206. J. Cell Sci. *128*, 3631.

Koutsoulidou, A., Mastroyiannopoulos, N.P., Furling, D., Uney, J.B., and Phylactou, L.A. (2011). Expression of miR-1, miR-133a, miR-133b and miR-206 increases during development of human skeletal muscle. BMC Developmental Biology *11*, 34–34.

Kouzarides, T. (2007). Chromatin Modifications and Their Function. Cell *128*, 693–705.

Kuang, S., Chargé, S.B., Seale, P., Huh, M., and Rudnicki, M.A. (2006). Distinct roles for Pax7 and Pax3 in adult regenerative myogenesis. The Journal of Cell Biology *172*, 103–113.

Kuang, S., Kuroda, K., Le Grand, F., and Rudnicki, M.A. (2007). Asymmetric Self-Renewal and Commitment of Satellite Stem Cells in Muscle. Cell *129*, 999–1010.

Laker, R.C., and Ryall, J.G. (2016). DNA Methylation in Skeletal Muscle Stem Cell Specification, Proliferation, and Differentiation. Stem Cells International *2016*, 5725927.

Latil, M., Rocheteau, P., Châtre, L., Sanulli, S., Mémet, S., Ricchetti, M., Tajbakhsh, S., and Chrétien, F. (2012). Skeletal muscle stem cells adopt a dormant cell state post mortem and retain regenerative capacity. Nature Communications *3*, 903.

Latimer, M., Sabin, N., Le Cam, A., Seiliez, I., Biga, P., and Gabillard, J.-C. (2017). miR-210 expression is associated with methionine-induced differentiation of trout satellite cells. J. Exp. Biol. *220*, 2932.

Lee, R.C., Feinbaum, R.L., and Ambros, V. (1993). The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. Cell *75*, 843–854.

Lee, S.-J., and McPherron, A.C. (2001). Regulation of myostatin activity and muscle growth. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *98*, 9306–9311.

Leferovich, J., Lana, D., Sutrave, P., Hughes, S., and Kelly, A. (1995). Regulation of c-ski transgene expression in developing and mature mice. J. Neurosci. *15*, 596.

Lescaudron, L., Peltékian, E., Fontaine-Pérus, J., Paulin, D., Zampieri, M., Garcia, L., and Parrish, E. (1999). Blood borne macrophages are essential for the triggering of muscle regeneration following muscle transplant. Neuromuscular Disorders *9*, 72–80.

Li, D., Deng, T., Li, H., and Li, Y. (2015). MiR-143 and miR-135 inhibitors treatment induces skeletal myogenic differentiation of human adult dental pulp stem cells. Archives of Oral Biology *60*, 1613–1617.

Liu, D., Black, B.L., and Derynck, R. (2001). TGF-β inhibits muscle differentiation through functional repression of myogenic transcription factors by Smad3. Genes & Development *15*, 2950–2966.

Liu, J., Luo, X., Xiong, A., Zhang, Z., Yue, S., Zhu, M., and Cheng, S.Y. (2010). MicroRNA-214 Promotes Myogenic Differentiation by Facilitating Exit from Mitosis via Down-regulation of Proto-oncogene N-ras. The Journal of Biological Chemistry *285*, 26599–26607.

Liu, L., Cheung, T.H., Charville, G.W., Hurgo, B.M.C., Leavitt, T., Shih, J., Brunet, A., and Rando, T.A. (2013). Chromatin Modifications as Determinants of Muscle Stem Cell Quiescence and Chronological Aging. Cell Reports *4*, 189–204.

Liu, N., Garry, G.A., Li, S., Bezprozvannaya, S., Sanchez-Ortiz, E., Chen, B., Shelton, J.M., Jaichander, P., Bassel-Duby, R., and Olson, E.N. (2017). A Twist2-dependent progenitor cell contributes to adult skeletal muscle. Nature Cell Biology *19*, 202.

Liu, N., Williams, A.H., Kim, Y., McAnally, J., Bezprozvannaya, S., Sutherland, L.B., Richardson, J.A., Bassel-Duby, R., and Olson, E.N. (2007). An intragenic MEF2-dependent enhancer directs muscle-specific expression of microRNAs 1 and 133. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *104*, 20844–20849.

Lozano-Velasco, E., Galiano-Torres, J., Jodar-Garcia, A., Aranega, A.E., and Franco, D. (2015). miR-27 and miR-125 Distinctly Regulate Muscle-Enriched Transcription Factors in Cardiac and Skeletal Myocytes. BioMed Research International *2015*, 391306.

MacFarlane, L.-A., and Murphy, P.R. (2010). MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. Current Genomics *11*, 537–561.

Mansouri, A., Stoykova, A., Torres, M., and Gruss, P. (1996). Dysgenesis of cephalic neural crest derivatives in Pax7−/− mutant mice. Development *122*, 831.

Mauro, A. (1961). SATELLITE CELL OF SKELETAL MUSCLE FIBERS. The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology *9*, 493–495.

McCarthy, J.J., Dupont-Versteegden, E.E., Fry, C.S., Murach, K.A., and Peterson, C.A. (2017). Methodological issues limit interpretation of negative effects of satellite cell depletion on adult muscle hypertrophy. Development *144*, 1363.

McCarthy, J.J., Mula, J., Miyazaki, M., Erfani, R., Garrison, K., Farooqui, A.B., Srikuea, R., Lawson, B.A., Grimes, B., Keller, C., et al. (2011). Effective fiber hypertrophy in satellite cell-depleted skeletal muscle. Development (Cambridge, England) *138*, 3657–3666.

Merly, F., Lescaudron, L., Rouaud, T., Crossin, F., and Gardahaut, M.F. (1999). Macrophages enhance muscle satellite cell proliferation and delay their differentiation. Muscle & Nerve *22*, 724–732.

Mi, L., Li, Y., Zhang, Q., Zhao, C., Peng, Y., Yang, G., and Zheng, X. (2014). MicroRNA-139-5p regulates C2C12 cell myogenesis through blocking Wnt/β-catenin signaling pathway. Biochem. Cell Biol. *93*, 8–15.

Miller, J.B., Schaefer, L., and Dominov, J.A. (1998). 6 Seeking Muscle Stem Cells. In Current Topics in Developmental Biology, R.A. Pedersen, and G.P. Schatten, eds. (Academic Press), pp. 191–219.

Mishima, Y., Abreu-Goodger, C., Staton, A.A., Stahlhut, C., Shou, C., Cheng, C., Gerstein, M., Enright, A.J., and Giraldez, A.J. (2009a. Zebrafish miR-1 and miR-133 shape muscle gene expression and regulate sarcomeric actin organization. Genes & Development *23*, 619–632.

Mitchell, K.J., Pannérec, A., Cadot, B., Parlakian, A., Besson, V., Gomes, E.R., Marazzi, G., and Sassoon, D.A. (2010). Identification and characterization of a non-satellite cell muscle resident progenitor during postnatal development. Nature Cell Biology *12*, 257.

Mok, G.F., Lozano-Velasco, E., and Münsterberg, A. (2017). microRNAs in skeletal muscle development. Seminars in Cell & Developmental Biology *72*, 67–76.

Mommsen, T.P. (2001). Paradigms of growth in fish. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology *129*, 207–219.

Montarras, D., L'honoré, A., and Buckingham, M. (2013). Lying low but ready for action: the quiescent muscle satellite cell. FEBS Journal *280*, 4036–4050.

Montarras, D., Morgan, J., Collins, C., Relaix, F., Zaffran, S., Cumano, A., Partridge, T., and Buckingham, M. (2005). Direct Isolation of Satellite Cells for Skeletal Muscle Regeneration. Science *309*, 2064.

Montfort, J., Le Cam, A., Gabillard, J.-C., and Rescan, P.-Y. (2016). Gene expression profiling of trout regenerating muscle reveals common transcriptional signatures with hyperplastic growth zones of the post-embryonic myotome. BMC Genomics *17*, 810.

Morrison, S.J., and Spradling, A.C. Stem Cells and Niches: Mechanisms That Promote Stem Cell Maintenance throughout Life. Cell *132*, 598–611.

Mourikis, P., Sambasivan, R., Castel, D., Rocheteau, P., Bizzarro, V., and Tajbakhsh, S. (2012). A Critical Requirement for Notch Signaling in Maintenance of the Quiescent Skeletal Muscle Stem Cell State. STEM CELLS *30*, 243–252.

Nachtigall, P.G., Dias, M.C., and Pinhal, D. (2014). Evolution and genomic organization of muscle microRNAs in fish genomes. BMC Evolutionary Biology *14*, 196.

Naguibneva, I., Ameyar-Zazoua, M., Polesskaya, A., Ait-Si-Ali, S., Groisman, R., Souidi, M., Cuvellier, S., and Harel-Bellan, A. (2006). The microRNA miR-181 targets the homeobox protein Hox-A11 during mammalian myoblast differentiation. Nature Cell Biology *8*, 278.

Nishiyama, T., Kaneda, R., Ono, T., Tohyama, S., Hashimoto, H., Endo, J., Tsuruta, H., Yuasa, S., Ieda, M., Makino, S., et al. (2012). miR-142-3p is essential for hematopoiesis and affects cardiac cell fate in zebrafish. Biochemical and Biophysical Research Communications *425*, 755–761.

Ogawa, R., Ma, Y., Yamaguchi, M., Ito, T., Watanabe, Y., Ohtani, T., Murakami, S., Uchida, S., De Gaspari, P., Uezumi, A., et al. (2014). Doublecortin marks a new population of transiently amplifying muscle progenitor cells and is required for myofiber maturation during skeletal muscle regeneration. Development *142*, 51–61.

Ogura, Y., Hindi, S.M., Sato, S., Xiong, G., Akira, S., and Kumar, A. (2015). TAK1 modulates satellite stem cell homeostasis and skeletal muscle repair. Nature Communications *6*, 10123.

Olguin, H.C., and Olwin, B.B. (2004). Pax-7 up-regulation inhibits myogenesis and cell cycle progression in satellite cells: a potential mechanism for self-renewal. Developmental Biology *275*, 375–388.

Ontell, M., and Kozeka, K. (1984). The organogenesis of murine striated muscle: A cytoarchitectural study. American Journal of Anatomy *171*, 133–148.

Orimo, S., Hiyamuta, E., Arahata, K., and Sugita, H. (1991). Analysis of inflammatory cells and complement C3 in bupivacaine-induced myonecrosis. Muscle & Nerve *14*, 515–520.

Oustanina, S., Hause, G., and Braun, T. (2004). Pax7 directs postnatal renewal and propagation of myogenic satellite cells but not their specification. The EMBO Journal *23*, 3430–3439.

Pallafacchina, G., Blaauw, B., and Schiaffino, S. (2013). Role of satellite cells in muscle growth and maintenance of muscle mass. Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases *23*, S12–S18.

Pallafacchina, G., François, S., Regnault, B., Czarny, B., Dive, V., Cumano, A., Montarras, D., and Buckingham, M. (2010). An adult tissue-specific stem cell in its niche: A gene profiling analysis of in vivo quiescent and activated muscle satellite cells. Stem Cell Research *4*, 77–91.

Paul, P.K., Gupta, S.K., Bhatnagar, S., Panguluri, S.K., Darnay, B.G., Choi, Y., and Kumar, A. (2010). Targeted ablation of TRAF6 inhibits skeletal muscle wasting in mice. The Journal of Cell Biology *191*, 1395–1411.

Pietrosemoli, N., Mella, S., Yennek, S., Baghdadi, M.B., Sakai, H., Sambasivan, R., Pala, F., Di Girolamo, D., and Tajbakhsh, S. (2017). Comparison of multiple transcriptomes exposes unified and divergent features of quiescent and activated skeletal muscle stem cells. Skeletal Muscle *7*, 28.

Pietsch, P. (1961). The effects of colchicine on regeneration of mouse skeletal muscle. The Anatomical Record *139*, 167–172.

Price, F.D., Von Maltzahn, J., Bentzinger, C.F., Dumont, N.A., Yin, H., Chang, N.C., Wilson, D.H., Frenette, J., and Rudnicki, M.A. (2014). Inhibition of JAK/STAT signaling stimulates adult satellite cell function. Nature Medicine *20*, 1174–1181.

Randolph, M.E., and Pavlath, G.K. (2015). A muscle stem cell for every muscle: variability of satellite cell biology among different muscle groups. Frontiers in Aging Neuroscience *7*, 190.

Relaix, F., Montarras, D., Zaffran, S., Gayraud-Morel, B., Rocancourt, D., Tajbakhsh, S., Mansouri, A., Cumano, A., and Buckingham, M. (2006). Pax3 and Pax7 have distinct and overlapping functions in adult muscle progenitor cells. J Cell Biol *172*, 91.

Relaix, F., Polimeni, M., Rocancourt, D., Ponzetto, C., Schäfer, B.W., and Buckingham, M. (2003). The transcriptional activator PAX3-FKHR rescues the defects of Pax3 mutant mice but induces a myogenic gain-of-function phenotype with ligand-independent activation of Met signaling in vivo. Genes & Development *17*, 2950–2965.

Relaix, F., Rocancourt, D., Mansouri, A., and Buckingham, M. (2004). Divergent functions of murine Pax3 and Pax7 in limb muscle development. Genes & Development *18*, 1088–1105.

Relaix, F., Rocancourt, D., Mansouri, A., and Buckingham, M. (2005). A Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells. Nature *435*, 948.

Relaix, F., and Zammit, P.S. (2012). Satellite cells are essential for skeletal muscle regeneration: the cell on the edge returns centre stage. Development *139*, 2845.

Rescan, P.-Y., Gauvry, L., Paboeuf, G., and Fauconneau, B. (1994). Identification of a muscle factor related to MyoD in a fish species. Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression *1218*, 202–204.

Rescan, P.-Y., Montfort, J., Fautrel, A., Rallière, C., and Lebret, V. (2013). Gene expression profiling of the hyperplastic growth zones of the late trout embryo myotome using laser capture microdissection and microarray analysis. BMC Genomics *14*, 173–173.

Rescan, P.-Y., Rallière, C., Lebret, V., and Fretaud, M. (2015). Analysis of muscle fibre input dynamics using a myog:GFP transgenic trout model. Journal of Experimental Biology *218*, 1137–1142.

Rescan, P.-Y. (2008). New insights into skeletal muscle development and growth in teleost fishes. Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution *310B*, 541–548.

Rescan, P.-Y., Gauvry, L., and 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 *362*, 89–92.

Rivas, D.A., Lessard, S.J., Rice, N.P., Lustgarten, M.S., So, K., Goodyear, L.J., Parnell, L.D., and Fielding, R.A. (2014). Diminished skeletal muscle microRNA expression with aging is associated with attenuated muscle plasticity and inhibition of IGF-1 signaling. The FASEB Journal *28*, 4133–4147.

Rocheteau, P., Gayraud-Morel, B., Siegl-Cachedenier, I., Blasco, M.A., and Tajbakhsh, S. (2012). A Subpopulation of Adult Skeletal Muscle Stem Cells Retains All Template DNA Strands after Cell Division. Cell *148*, 112–125.

Rodgers, J.T., King, K.Y., Brett, J.O., Cromie, M.J., Charville, G.W., Maguire, K.K., Brunson, C., Mastey, N., Liu, L., Tsai, C.-R., et al. (2014). mTORC1 controls the adaptive transition of quiescent stem cells from G0 to GAlert. Nature *510*, 393–396.

Rouger, K., Brault, M., Daval, N., Leroux, I., Guigand, L., Lesoeur, J., Fernandez, B., and Cherel, Y. (2004). Muscle satellite cell heterogeneity: in vitro and in vivo evidences for populations that fuse differently. Cell and Tissue Research *317*, 319–326.

Rowe, R.W., and Goldspink, G. (1969). Muscle fibre growth in five different muscles in both sexes of mice. Journal of Anatomy *104*, 519–530.

Rowlerson, A., Mascarello, F., Radaelli, G., and Veggetti, A. (1995). Differentiation and growth of muscle in the fish Sparus aurata (L): II. Hyperplastic and hypertrophic growth of lateral muscle from hatching to adult.

Rudnicki, M.A., Le Grand, F., McKinnell, I., and Kuang, S. (2008). The Molecular Regulation of Muscle Stem Cell Function. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology *73*, 323–331.

Rudnicki, M.A., Schnegelsberg, P.N.J., Stead, R.H., Braun, T., Arnold, H.-H., and Jaenisch, R. (1993). MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. Cell *75*, 1351–1359.

Ryall, J.G., Dell'Orso, S., Derfoul, A., Juan, A., Zare, H., Feng, X., Clermont, D., Koulnis, M., Gutierrez-Cruz, G., Fulco, M., et al. (2015). The NAD+-Dependent SIRT1 Deacetylase Translates a Metabolic Switch into Regulatory Epigenetics in Skeletal Muscle Stem Cells. Cell Stem Cell *16*, 171–183.

Sabourin, L. A. and Rudnicki, M. A. (2001). The molecular regulation of myogenesis. Clinical Genetics *57*, 16–25.

Sacco, A., Doyonnas, R., Kraft, P., Vitorovic, S., and Blau, H.M. (2008). Self-renewal and expansion of single transplanted muscle stem cells. Nature *456*, 502.

Sampath, S.C., Sampath, S.C., Ho, A.T.V., Corbel, S.Y., Millstone, J.D., Lamb, J., Walker, J., Kinzel, B., Schmedt, C., and Blau, H.M. (2018). Induction of muscle stem cell quiescence by the secreted niche factor Oncostatin M. Nature Communications *9*, 1531.

Sato, T., Yamamoto, T., and Sehara-Fujisawa, A. (2014). miR-195/497 induce postnatal quiescence of skeletal muscle stem cells. Nat Commun *5*,.

Scaal, M., and Christ, B. (2004). Formation and differentiation of the avian dermomyotome. Anatomy and Embryology *208*, 411–424.

Schienda, J., Engleka, K.A., Jun, S., Hansen, M.S., Epstein, J.A., Tabin, C.J., Kunkel, L.M., and Kardon, G. (2006). Somitic origin of limb muscle satellite and side population cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *103*, 945–950.

Schultz, E. (1996). Satellite Cell Proliferative Compartments in Growing Skeletal Muscles. Developmental Biology *175*, 84–94.

Schultz, E. (1989). Satellite cell behavior during skeletal muscle growth and regeneration. Medicine & Science in Sports & Exercise *21*, S187–S197.

Seale, P., Sabourin, L.A., Girgis-Gabardo, A., Mansouri, A., Gruss, P., and Rudnicki, M.A. (2000). Pax7 Is Required for the Specification of Myogenic Satellite Cells. Cell *102*, 777–786.

Serrano, A.L., Baeza-Raja, B., Perdiguero, E., Jardí, M., and Muñoz-Cánoves, P. (2008). Interleukin-6 Is an Essential Regulator of Satellite Cell-Mediated Skeletal Muscle Hypertrophy. Cell Metabolism *7*, 33–44.

Shinin, V., Gayraud-Morel, B., Gomès, D., and Tajbakhsh, S. (2006). Asymmetric division and cosegregation of template DNA strands in adult muscle satellite cells. Nature Cell Biology *8*, 677.

Steinbacher, P., Stadlmayr, V., Marschallinger, J., Saänger, A., and Stoiber, W. (2008). Lateral Fast Muscle Fibers Originate From the Posterior Lip of the Teleost Dermomyotome. Developmental Dynamics : an Official Publication of the American Association of Anatomists *237*, 3233–3239.

Steinbacher P., Haslett J.R., Obermayer A., Marschallinger J., Bauer H.C., Sänger A.M., and Stoiber W. (2007). MyoD and Myogenin expression during myogenic phases in brown trout: A precocious onset of mosaic hyperplasia is a prerequisite for fast somatic growth. Developmental Dynamics *236*, 1106–1114.

Stellabotte Frank and Devoto Stephen H. (2007). The teleost dermomyotome. Developmental Dynamics *236*, 2432–2443.

Stickland, N.C. (1983). Growth and development of muscle fibres in the rainbow trout (Salmo gairdneri). Journal of Anatomy *137*, 323–333.

Sutrave, P., Kelly, A.M., and Hughes, S.H. (1990). ski can cause selective growth of skeletal muscle in transgenic mice. Genes & Development *4*, 1462–1472.

Tang, Z., Liu, N., Luo, L., Kang, K., Li, L., Ni, R., Qiu, H., and Gou, D. (2017). MicroRNA-17-92 Regulates the Transcription Factor E2F3b during Myogenesis In Vitro and In Vivo. International Journal of Molecular Sciences *18*, 727.

Tortora, G.., and Grabowski, S.. (1994). Principes d'anatomie et de physiologie (CEC)

Toto, P.C., Puri, P.L., and Albini, S. (2016). SWI/SNF-directed stem cell lineage specification: dynamic composition regulates specific stages of skeletal myogenesis. Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS *73*, 3887–3896.

Troy, A., Cadwallader, A.B., Fedorov, Y., Tyner, K., Tanaka, K.K., and Olwin, B.B. (2012). Coordination of Satellite Cell Activation and Self-Renewal by Par-Complex-Dependent Asymmetric Activation of p38α/β MAPK. Cell Stem Cell *11*, 541–553.

Tumbar, T., Guasch, G., Greco, V., Blanpain, C., Lowry, W.E., Rendl, M., and Fuchs, E. (2004). Defining the Epithelial Stem Cell Niche in Skin. Science (New York, N.Y.) *303*, 359–363.

Veggetti, A., Mascarello, F., Scapolo, P.A., and Rowlerson, A. (1990). Hyperplastic and hypertrophic growth of lateral muscle in Dicentrarchus labrax (L.). Anatomy and Embryology *182*, 1–10.

Voog, J., and Jones, D.L. (2010). Stem Cells and the Niche: A Dynamic Duo. Cell Stem Cell *6*, 103–115.

W. Chu, J. Cheng, X. Zhu, P. Wu, L. Chen, J. Wang, Y. Wu, and M. Zeng and J. Zhang (2016). Identification and Characterization of Follistatin-Related Protein-1 Involved in the Regulation of Chinese Perch Skeletal Muscle Hyperplasia. Current Molecular Medicine *16*, 596–604.

Wagatsuma, A., and Sakuma, K. (2013). Mitochondria as a Potential Regulator of Myogenesis. The Scientific World Journal *2013*, 9.

Wang, Y.X., and Rudnicki, M.A. (2011). Satellite cells, the engines of muscle repair. Nature Reviews Molecular Cell Biology *13*, 127.

Wei, W., He, H.-B., Zhang, W.-Y., Zhang, H.-X., Bai, J.-B., Liu, H.-Z., Cao, J.-H., Chang, K.-C., Li, X.-Y., and Zhao, S.-H. (2013). miR-29 targets Akt3 to reduce proliferation and facilitate differentiation of myoblasts in skeletal muscle development. Cell Death & Disease *4*, e668.

White, R.B., Biérinx, A.-S., Gnocchi, V.F., and Zammit, P.S. (2010). Dynamics of muscle fibre growth during postnatal mouse development. BMC Developmental Biology *10*, 21.

Wightman, B., Ha, I., and Ruvkun, G. (1994). Wightman, B. , Ha, I. & Ruvkun, G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in C. elegans. Cell 75, 855-862.

Wu, J., He, D., Yue, B., Zhang, C., Fang, X., and Chen, H. (2017). miR-101-1 expression pattern in Qinchuan cattle and its role in the regulation of cell differentiation. Gene *636*, 64–69.

Xie, T., and Spradling, A.C. (2000). A Niche Maintaining Germ Line Stem Cells in the Drosophila Ovary. Science *290*, 328.

Xu, M., Chen, X., Huang, Z., Chen, D., Yu, B., Chen, H., He, J., Zheng, P., Luo, J., Yu, J., et al. (2018). MicroRNA-139-5p suppresses myosin heavy chain I and IIa expression via inhibition of the calcineurin/NFAT signaling pathway. Biochemical and Biophysical Research Communications *500*, 930–936.

Yan, B., Zhu, C.-D., Guo, J.-T., Zhao, L.-H., and Zhao, J.-L. (2013). miR-206 regulates the growth of the teleost tilapia (Oreochromis niloticus) through the modulation of IGF-1 gene expression. J. Exp. Biol. *216*, 1265.

Yin, H., Price, F., and Rudnicki, M.A. (2013). Satellite Cells and the Muscle Stem Cell Niche. Physiological Reviews *93*, 23–67.

Yonemura, S., Itoh, M., Nagafuchi, A., and Tsukita, S. (1995). Cell-to-cell adherens junction formation and actin filament organization: similarities and differences between non-polarized fibroblasts and polarized epithelial cells. J. Cell Sci. *108*, 127.

Zhang, B.-W., Cai, H.-F., Wei, X.-F., Sun, J.-J., Lan, X.-Y., Lei, C.-Z., Lin, F.-P., Qi, X.-L., Plath, M., and Chen, H. (2016). miR-30-5p Regulates Muscle Differentiation and Alternative Splicing of Muscle-Related Genes by Targeting MBNL. International Journal of Molecular Sciences *17*, 182.

Zhao, Q., Kang, Y., Wang, H.-Y., Guan, W.-J., Li, X.-C., Jiang, L., He, X.-H., Pu, Y.-B., Han, J.-L., Ma, Y.-H., et al. (2016). Expression profiling and functional characterization of miR-192 throughout sheep skeletal muscle development. Scientific Reports *6*, 30281.

Zhu, H., Xiao, F., Wang, G., Wei, X., Jiang, L., Chen, Y., Zhu, L., Wang, H., Diao, Y., Wang, H., et al. (2016). STAT3 Regulates Self-Renewal of Adult Muscle Satellite Cells during Injury-Induced Muscle Regeneration. Cell Reports *16*, 2102–2115.

Zismanov, V., Chichkov, V., Colangelo, V., Jamet, S., Wang, S., Syme, A., Koromilas, A.E., and Crist, C. (2016). Phosphorylation of eIF2α Is a Translational Control Mechanism Regulating Muscle Stem Cell Quiescence and Self-Renewal. Cell Stem Cell *18*, 79–90.

ANNEXES

Annexe 1 : Communication Orale réalisée au « 5th. International Symposium on Genomics in Aquaculture » à Albufeira (Portugal) du 21 au 23 Mars 2018.

Histological, transcriptomic and *in vitro* analysis reveals an intrinsic activated state of myogenic precursors in hyperplastic muscle of trout

Jagot, S., Sabin, N., Le Cam, A., Bugeon, J., Rescan, P.Y., Gabillard, J.C.
LPGP, INRA, 35000 Rennes, France

SUMMARY

Post hatching growth in trout muscle is characterized by fiber hypertrophy and hyperplasia. Hyperplasia is defined by production of additional nascent fibers that involves lasting muscle stem cell activation. The aim of this study was to characterize cellular and molecular mechanisms maintaining the activated state of myogenic precursors during fish hyperplasia growth. For this purpose, we examined *in situ* proliferation, *in vitro* cell behavior and transcriptomic profile of 24H-cultured myogenic precursors originating from juvenile trout displaying hyperplasia (Growing Trout, GT) compared to myogenic precursors from fasted juvenile (Fasted Trout, FT) trout in growth arrest and from adult trout (Adult Trout, AT) which does not exhibit hyperplasic growth.

For the first time we showed that myogenic precursors proliferated in hyperplasic muscle as shown by in vivo Brdu labelling. Myogenic cells from FT and AT displayed close expression profiles with only 64 differentially expressed genes. In contrast, 2623 differentially expressed genes were found between myogenic cells from GT and presumably quiescent myogenic cells from both FT and AT. Functional categories related to protein metabolism, metabolic process, proliferation and myogenic differentiation were inferred from genes up regulated in GT compared to AT and FT myogenic cells. Conversely, Notch signaling pathway, that signs cellular quiescence was inferred from the genes down regulated in GT compared to the two others situations. In line with our transcriptomic data GT myogenic precursors displayed higher myogenic potentiality than FT and AT myogenic precursors as confirmed by their high proliferative capacity and their ability to form new myotubes *in vitro*.

In conclusion, transcriptomic analysis and examination of cell behavior converge to support the view that myogenic cells extracted from hyperplastic muscle of juvenile trout are intrinsically more potent to form myofibres than myogenic cells extracted from adult or fasted muscle. The generation of gene expression profiles in myogenic cell extracted from muscle of juvenile trout may yield insights into the molecular and cellular mechanisms controlling hyperplasia and provides a useful list of potential molecular markers of hyperplasic muscle.

Annexe 2 : Communication Orale réalisée au « Journées d'animation scientifiques du département Phase » à Rennes (France) du 04 au 05 Avril 2018.

L'analyse histologique, transcriptomique et *in vitro* révèlent un état activé des précurseurs myogéniques du muscle hyperplasique de la truite

Jagot, S., Sabin, N., Le Cam, A., Bugeon, J., Rescan, P.Y., Gabillard, J.C.
LPGP, INRA, 35000 Rennes, France

RESUME

Chez la plupart des poissons, la croissance musculaire se maintient durablement au cours de la vie de l'animal et résulte d'une augmentation de la taille (hypertrophie) et du nombre de fibres musculaires (hyperplasie). Il n'y a pas d'hyperplasie musculaire chez les amniotes (mammifères et oiseaux) après la période qui suit la naissance ou l'éclosion ; seule l'augmentation de la taille des fibres rend compte de la croissance musculaire des amniotes. Nous faisons ici l'hypothèse que l'hyperplasie musculaire propre aux poissons résulte d'un état physiologique particulier des cellules souches musculaires du poisson les prédisposant à l'auto- renouvellement et à la différenciation. Pour caractériser les propriétés intrinsèques des cellules satellites du muscle hyperplasique du poisson, nous avons comparé la prolifération *in situ*, le comportement *in vitro* et le transcriptome, de précurseurs myogéniques extraits de muscle de truites juvéniles en forte croissance hyperplasique (GT), et de précurseurs myogéniques extraits de muscles de truites ne présentant plus d'hyperplasie musculaire, à savoir des truites soumises à un jeun prolongé (FT) ou des truites adultes (AT).

Nos travaux montrent pour la première fois une prolifération des précurseurs myogéniques dans le muscle hyperplasique de truite. Les précurseurs myogéniques FT et AT présentent un transcriptome très proche avec seulement 64 gènes différentiellement exprimés. Ceci contraste avec les 2623 gènes différentiellement exprimés entre les GT et les deux conditions d'arrêt de croissances (FT et AT). Parmi les gènes surexprimés chez les GT, il y a un enrichissement pour les catégories fonctionnelles impliquées dans le métabolisme protéique, le métabolisme cellulaire, la prolifération et la différenciation myogénique. En outre, nous avons trouvé parmi les gènes sous-exprimés, un enrichissement de gènes impliqué dans la voie Notch indiquant une répression des marqueurs de quiescence. En cohérence avec les signatures transcriptomiques trouvées, nous avons également montré que les précurseurs myogéniques GT présentaient de plus grandes capacités de prolifération et de différenciation *in vitro* comparées aux AT et FT.

En conclusion, les analyses transcriptomiques et *in vitro* convergent et étayent l'idée selon laquelle les précurseurs myogéniques extraits de muscle en croissance hyperplasique présentent de plus grandes capacités intrinsèques à former des myofibres comparé aux précurseurs myogéniques extraits de muscle de truites adultes ou juvéniles soumises à un jeûne. Les profils d'expressions géniques dans les précurseurs myogéniques de jeunes truites permettent de mieux comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires qui contrôlent l'hyperplasie. L'identification de marqueurs potentiels de la croissance musculaire hyperplasique permettra à terme de maîtriser la croissance et certains paramètres de qualité telle que la texture de la chair.

UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE / ECOLOGIE GEOSCIENCES AGRONOMIE ALIMENTATION

AGRO CAMPUS OUEST

Titre : Caractérisation moléculaire et cellulaire des précurseurs myogéniques du muscle hyperplasique de la truite

Mots clés : poisson, myoblastes, prolifération, différenciation, hyperplasie, cellules souches musculaires

Résumé : La remarquable capacité de croissance musculaire des poissons est liée notamment à leur capacité à produire durablement de nouvelles fibres (hyperplasie). Nous avons cherché à caractériser au niveau cellulaire et moléculaire les propriétés intrinsèques des précurseurs myogéniques de muscle hyperplasique de la truite. Ainsi, nous avons comparé la prolifération *in situ*, le comportement *in vitro*, et les transcriptomes (ARN messagers et miARN) de précurseurs myogéniques de muscle hyperplasique de truites juvéniles (JT) et de muscles non-hyperplasiques de truites juvéniles soumises à un jeûne prolongé (FJT) ou de truites adultes (AT).

Nous avons observé un fort taux de prolifération des cellules satellites au sein du muscle hyperplasique comparé au muscle non-hyperplasique. L'analyse du transcriptome montre que les gènes surexprimés dans les précurseurs du muscle hyperplasique (JT) sont principalement impliqués dans l'activité mitochondriale, le cycle cellulaire et la différenciation myogénique. L'analyse du miRnome a mis en évidence des miARN surexprimés chez les JT dont les cibles potentielles régulent la prolifération ou la différenciation. En accord avec ces résultats, les précurseurs myogéniques JT présentent *in vitro* des capacités de prolifération et de différenciation plus élevées que les précurseurs myogéniques FJT et AT.

L'ensemble de nos résultats montrent que les précurseurs myogéniques extraits de muscle en croissance hyperplasique présentent, de par les expressions géniques dont ils sont le siège et leur comportement *in vitro*, de plus grandes capacités intrinsèques à former des myofibres comparés aux précurseurs myogéniques extraits de muscle non-hyperplasique.

Title : Molecular and cellular characterization of myogenic precursors from hyperplastic trout muscles

Keywords : fish; myoblast; proliferation; differentiation; hyperplasia; muscle stem cell.

Abstract : The dramatic increase in myotomal muscle mass in fish is related to their unique ability to lastingly produce new muscle fibres, a process termed hyperplasia. In this study, we aimed to characterize intrinsic properties of myogenic cells originating from hyperplasic fish muscle. For this purpose, we compared *in situ* proliferation, *in vitro* cell behavior and transcriptomes (RNAs and miRNAs) of myogenic precursors from hyperplasic muscle of juvenile trout (JT) and from non-hyperplastic muscle of fasted juvenile trout (FJT) and adult trout (AT).

We showed an higher proliferation rate of trout satellite cells *in vivo* in hyperplastic muscle compared to non-hyperplastic muscle. Functional analysis of transcriptomics data showed, among the over-expressed genes in JT myogenic cells compared to AT and FJT, an enrichment in genes related to mitochondrial activity, cell cycle and myogenic differentiation. We found also an enrichment in genes involved in Notch signaling pathway, indicating a repression of quiescency markers in JT myogenic cells compared to AT and FJT. Moreover, the miRnome analysis also revealed overexpressed miRNAs in JT whose targets may regulate the proliferation and the differentiation of myogenic precursors. In line with our results, JT myogenic precursors displayed *in vitro* higher proliferation and differentiation capacities than FJT and AT myogenic precursors.

On the whole, our results converge to support the view that myogenic cells extracted from hyperplastic muscle of juvenile trout are intrinsically more potent to form myofibres than myogenic cells extracted from non-hyperplasic muscle.