

Développement des modèles de culture cellulaire de muscle en 3D : de nouvelles opportunités pour les productions animales

DESSAUGE Frédéric¹, SCHLEDER Cindy², PERRUCHOT Marie-Hélène¹, ROUGER Karl²

¹PEGASE, INRAE, Institut Agro, 35590, Saint-Gilles, France

²PAnTher, INRAE, Oniris, 44307, Nantes, France

Courriel : marie-helene.perruchot@inrae.fr

■ La culture de la viande *in vitro* a permis à la science d'accélérer ses connaissances sur la culture des cellules musculaires. D'énormes progrès sur les supports et les conditions de culture ont été faites pour ressembler le mieux possible à un muscle.

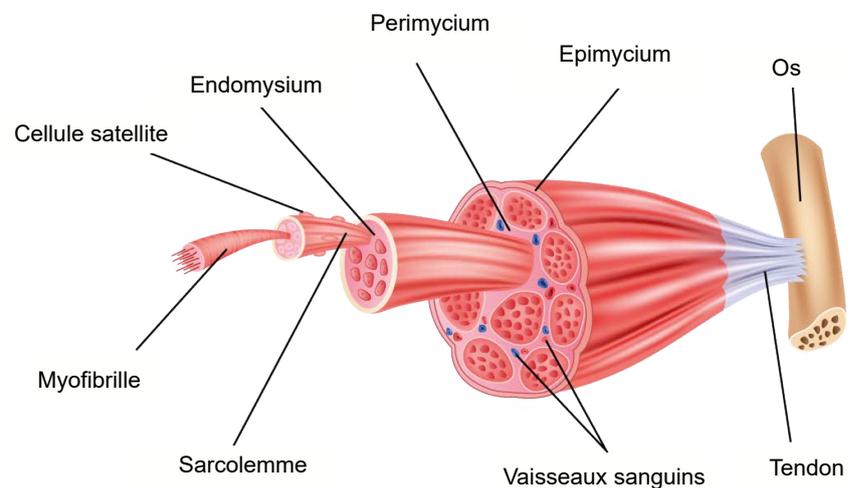
Introduction

Le muscle squelettique est le tissu le plus abondant, représentant 35 à 45 % de la masse corporelle totale (Janssen *et al.*, 2000). Il fonctionne pour générer une force qui permet la locomotion, la posture, la déglutition et la respiration. Il est composé d'un mélange de fibres différenciées terminales qui représentent les unités contractiles de base regroupées en faisceaux (figure 1). Chaque fibre musculaire squelettique est une cellule musculaire cylindrique unique. Un muscle squelettique individuel peut être constitué de centaines, voire de milliers, de fibres musculaires regroupées et enveloppées dans un revêtement de tissu conjonctif. Chaque muscle est entouré d'une gaine de tissu conjonctif appelée épimysium. Le fascia, tissu conjonctif extérieur à l'épimysium, entoure et sépare les muscles. Des portions de l'épimysium se projettent vers l'intérieur pour diviser le muscle en compartiments. Chaque compartiment contient un faisceau de fibres musculaires. Chaque faisceau de fibres musculaires est entouré d'une couche de

tissu conjonctif appelée pérимыsium. Dans le faisceau, chaque cellule musculaire individuelle, appelée fibre musculaire, est entourée de tissu conjonctif appelé endomysium. Le revêtement de tissu conjonctif fournit un soutien et une protection aux cellules fragiles et leur permet de résister aux forces de contraction. Les revêtements fournissent également des voies pour le passage des vaisseaux sanguins et des nerfs. Généralement, l'épimysium,

le pérимыsium et l'endomysium s'étendent au-delà de la partie charnue du muscle pour former un tendon épais en forme de corde ou une large aponévrose plate en forme de feuille. Le tendon et l'aponévrose forment des attaches indirectes des muscles au périoste des os ou au tissu conjonctif d'autres muscles. Généralement, un muscle s'étend sur une articulation et est attaché aux os par des tendons aux deux extrémités. Les muscles

Figure 1. Structure d'un muscle squelettique (adobe stock).



squelettiques sont abondants en vaisseaux sanguins et en nerfs. Ceci est directement lié à la fonction principale du muscle squelettique, la contraction. Avant qu'une fibre musculaire squelettique puisse se contracter, elle doit recevoir une impulsion d'une cellule nerveuse. Généralement, une artère et au moins une veine accompagnent chaque nerf qui pénètre dans l'épimysium d'un muscle squelettique. Le développement du muscle, sa composition et sa capacité d'adaptation dépendent des cellules souches musculaires, principalement des cellules satellites (SATC). Les SATC jouent un rôle essentiel pour le développement musculaire ainsi que pour le maintien, la régénération et l'adaptation du tissu musculaire car elles sont capables de se différencier et de s'auto-renouveler (Mitchell *et al.*, 2010 ; Dumont *et al.*, 2015). Les SATC adultes quiescentes sont situées dans une niche située entre le sarcolemme et la lame basale. Après un certain nombre de cycles prolifératifs, les SATC activées subissent une différenciation myogénique soit en fusionnant entre elles pour former de nouvelles myofibres soit avec des myofibres existantes (Bérard *et al.*, 2011). Par conséquent, le nombre de myonoyaux sous-laminaux diminue continuellement au cours de la croissance et reste relativement constant dans le muscle adulte (Rouger *et al.*, 2004). En plus d'une diminution du nombre de SATC au cours de la vie, une perte progressive de la capacité des cellules souches à se différencier survient avec l'âge et engendre des maladies chroniques chez les mammifères (Ogura *et al.*, 2020). Dans les muscles malades et âgés, les myofibres sont progressivement remplacées par du tissu adipeux et fibreux tandis que les fibres restantes diminuent en masse. Il a été montré chez le porc que dans la première semaine de vie, 30 % des SATC sont capables de se différencier puis cette proportion diminue de la semaine 7 (14 %) à la semaine 21 (9 %) (Mesires et Doumit, 2002). Il est ainsi admis que seules certaines SATC se différencient et fusionnent par la suite avec les myofibres existantes, tandis que d'autres forment un pool de cellules réserves/souches crucial pour le maintien et la régénération du muscle.

1. Limites des cultures 2D et intérêt des tissus musculaires squelettiques issus de la bio-ingénierie

La culture cellulaire conventionnelle en deux dimensions (2D) repose sur l'adhérence à une surface plane, généralement une boîte de Pétri en verre ou en polystyrène, pour fournir un support mécanique aux cellules. La croissance cellulaire en monocouche 2D permet d'accéder à une quantité similaire de nutriments et de facteurs de croissance présents dans le milieu, ce qui entraîne une prolifération homogène, dans des conditions hautement contrôlées. Dans les systèmes 2D, des cultures primaires de myoblastes ont été développées chez de nombreuses espèces comme le Singe, le Porc, le Bovin, le Poulet et le Poisson. Si de telles cultures sont bien connues et contrôlées, elles présentent en retour plusieurs limites critiques, parmi lesquelles une non-durabilité dans le temps, un manque d'architecture musculaire native et une difficulté à produire des contractions spontanées (Eberli *et al.*, 2009 ; Guo *et al.*, 2014). Par ailleurs, elles ne reflètent pas complètement l'organisation structurelle et le métabolisme du muscle adulte qui sont pourtant essentielles à la contraction et à la fonctionnalité du muscle (Lieber et Fridén, 2000). Cela limite donc l'utilisation des systèmes de culture 2D dans les études biologiques ainsi que dans le remplacement de tissus pathologiques ou endommagés *in vivo* (Ghaemmaghami *et al.*, 2012). Enfin, la culture cellulaire avec les systèmes *in vitro* conventionnels actuels présente des limites importantes liées à leur faible rapport surface/volume, l'absence de contrôle du pH, de la concentration en gaz ou en métabolites et n'est donc pas en cela évolutive (Oh *et al.*, 1999). Pour finir, le développement de systèmes 3D *in vitro* est motivé par la nécessité d'atténuer les considérations éthiques exigeant une réduction de l'utilisation d'animaux et d'améliorer les résultats chez les patients humains par l'identification de nouvelles thérapies grâce au criblage de médicaments et aux tests cellulaires (Bhatia et Ingber, 2014).

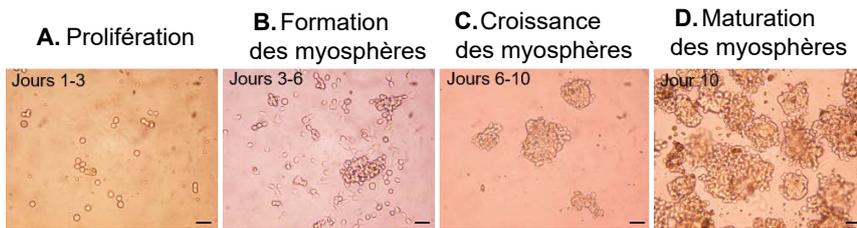
2. Développement d'un modèle 3D de culture cellulaire primaire dérivée du muscle : les myosphères

Au cours des dernières décennies, l'efficacité des stratégies thérapeutiques cellulaires pour les atteintes musculaires ainsi que la production de connaissances génériques sur la biologie des cellules souches musculaires ont été entravées par des difficultés récurrentes à isoler et à propager les cellules souches résidentes dans des tissus dans leur état natif. En effet, dans des conditions de culture 2D conventionnelles, les cellules dérivées du muscle se différencient rapidement et perdent leur capacité à être greffées (Ikemoto *et al.*, 2007). En outre, les mécanismes liés à la quiescence, l'auto-renouvellement et la différenciation des CS sont difficiles à analyser *in vitro* car leurs capacités de différenciation est perdue lorsqu'elles sont retirées de leur niche tissulaire et ne sont pas suffisamment reproduites dans les modèles de culture 2D actuellement disponibles. Pour toutes ces raisons, une méthode de culture en suspension a été développée pour que les interactions cellule-cellule en 3D fournissent un environnement de type niche et aident à maintenir les cellules dans un état plus primitif (Obokata *et al.*, 2011).

La myosphère correspond à une structure 3D générée à partir de cellules dérivées du muscle fraîchement isolées et qui se forme progressivement 3 jours après l'ensemencement initial de la suspension cellulaire mononucléée comme schématisé dans la [figure 2](#) (Sarig *et al.*, 2006 ; Arsic *et al.*, 2008 ; Westerman, 2015).

Dans les premiers jours après l'isolement des cellules du tissu musculaire, obtenue après une dissociation mécanique et enzymatique, de petites cellules rondes, principalement individualisées, sont observées flottant parmi les débris. Au cours des jours suivants, les cellules individualisées évoluent en petits amas de quelques cellules, puis en amas plus grands d'une dizaine de cellules et forment plus tard des structures sphériques arrondies. Ces myosphères ont initialement une taille de 25 à 50 μm et

Figure 2. Microscopie à contraste de phase de cultures murines de myosphères classiques.



A. Lorsqu'elles sont cultivées en suspension, les cellules progénitrices/souches correspondent initialement à quelques cellules arrondies, petites et réfringentes. Dans les 1^{ers} jours (jour 1-3) certaines d'entre elles peuvent apparaître en amas de deux à quatre cellules (**B**). Entre 3 à 6 jours, elles commencent à croître selon des modalités atypiques avec la formation de colonies de microsphéroïdes composées de quelques dizaines de cellules jointes qui pouvaient parfois apparaître superposées. Dans les jours suivants (jour 6-10), ces myosphères flottantes continuent de croître en taille et en nombre, atteignant plusieurs centaines de cellules (**C**). Après 10 jours, les myosphères apparaissent telles des complexes sphéroïdes très denses en cellules et volumineux et perdent leur capacité de prolifération (**D**). Barre d'échelle = 25 μ m. Iconographies liées aux travaux menés sur la caractérisation *in vitro* des cellules canines MuStem. D'après Dessauge *et al.* (2021).

continuent à croître au fil du temps pour atteindre des tailles de 200 à 400 μ m. Les myosphères se propagent ensuite *in vitro* sous forme d'amas flottants de cellules arrondies présentant des diamètres différents. Elles peuvent être repiquées tous les 20-30 jours en piégeant des sphères > 100 μ m, en les dissociant avec de la dispase/collagénase puis en ensemençant les cellules à une densité de $1-10 \times 10^5$ cellules/mL. Les cellules issues des myosphères nouvellement remises en culture formeront à leur tour de nouvelles sphères flottantes après plusieurs jours de culture. La caractérisation des myosphères chez la souris a révélé qu'elles contiennent des cellules myogéniques exprimant la protéine de surface (intégrine $\alpha 7$) et des facteurs de transcription (Pax7, Myf5 et MyoD) mais aussi des cellules non myogéniques n'exprimant pas l'intégrine $\alpha 7$, mais positives pour PDGFR α et Sca-1. Il a été suggéré que ce deuxième type cellulaire correspondait à une population de cellules interstitielles (Penvose et Westerman, 2012). Fait intéressant, il a été déterminé que les cellules dérivées des myosphères se comportent de manière similaire aux myoblastes primaires en ce sens qu'elles expriment principalement Pax7, Myf5 et MyoD et sont capables de former des myotubes multinucléés lorsqu'elles sont cultivées en condition adhérente (Westerman, 2015). Cependant, certaines différences en termes de taux de prolifération, de capacité de différenciation et de phénotype ont été rapportées entre les myosphères générées par plusieurs groupes, selon la procédure d'iso-

lement et les milieux de culture utilisés. L'ajout de facteur inhibiteur de la leucémie (LIF) au milieu de croissance des myosphères améliore la prolifération et augmente considérablement la proportion de cellules exprimant Sca-1.

De façon intéressante, il a été établi que certaines des cellules dérivées du muscle dans les myosphères sont capables de maintenir un état pré-myogénique en culture au fil du temps (Westerman *et al.*, 2010). À titre d'exemple, les myosphères générées à partir de cellules musculaires squelettiques du cou humain peuvent être cultivées et développées pendant 20 semaines ou 18 passages même lorsqu'elles sont obtenues à un âge moyen du donneur de 63 ans, démontrant une capacité d'auto-renouvellement importante (Wei *et al.*, 2011). De plus, les myosphères peuvent être isolées à partir de muscles de souris jeunes et âgées et peuvent être maintenues en culture sur des périodes prolongées (3-4 mois). Il a été évoqué que les interactions 3D développées entre les cellules adhérentes sont impliquées dans le maintien des structures sphériques de la myosphère mais également dans le maintien de leur longévité *in vitro* (Penvose et Westerman, 2012).

Grâce à leur structure 3D, les myosphères permettent d'obtenir des interactions cellule-cellule et une organisation spatiale entre différents types cellulaires plus proches de celles observées dans les tissus par rapport aux systèmes de culture 2D classiques. Contrairement

aux cultures primaires dérivées de cellules dérivées du muscle cultivées en 2D dans lesquelles les progéniteurs sont rapidement perdus en raison de leur faible temps de division par rapport aux autres types de cellules résidentes, la culture de myosphères permet de maintenir les proportions cellulaires au cours des divisions. Un autre avantage est que la procédure de culture initiale est simple et relativement douce avec peu de manipulation des cellules dérivées du muscle fraîchement extraites. Cela contraste avec de nombreuses procédures d'isolement de CS qui intègrent l'utilisation de la cytométrie en flux, connue pour activer les CS et ainsi altérer leur profil d'expression génique (van den Brink *et al.*, 2017). À titre d'exemple, l'expression de Notch1, qui joue un rôle central dans la détermination du comportement des CS, est modifiée dans les CS (Liu *et al.*, 2007). Concernant la contribution des myosphères à la régénération musculaire, il a été montré chez l'homme que les cellules dérivées des myosphères participent à la formation de nouvelles fibres musculaires et à la génération de CS lorsqu'elles sont injectées dans les muscles endommagés. Aussi, les auteurs mentionnent qu'elles présentent une capacité de greffage supérieure à celle des myoblastes. Conformément à ces résultats, Westerman *et al.* (2010) ont démontré que l'injection de cellules fluorescentes, dérivées de myosphères dans le muscle de souris dystrophiques générait la formation de fibres musculaires exprimant la GFP deux semaines plus tard. Ces résultats ont souligné que les cellules dérivées des myosphères ont la capacité de régénérer le muscle blessé *in vivo* tout en conservant les propriétés des cellules souches. Cela démontre ainsi que les cellules dérivées des myosphères peuvent être très utiles en médecine régénérative pour le traitement des maladies musculaires.

3. Développement de modèles 3D de muscles squelettiques : les myobundles

Depuis les travaux pionniers conduisant à la formation de myotubes dans un gel de collagène (Vandenburg,

1988) et à la construction de couches en 3D (Dennis et Kosnik, 2000), le domaine de l'ingénierie musculaire s'est considérablement développé. L'approche d'ingénierie est maintenant basée sur l'exploitation de deux composants principaux correspondant à un biomatériau qui assure une structure tissulaire appropriée et différents types de cellules résidentes dans les tissus. Concernant les matériaux de structure, ils doivent être inertes, résorbables par des processus de biodégradation, modifiables et présenter une cytotoxicité minimale (Fuoco *et al.*, 2012 ; Rizzi *et al.*, 2012). En outre, les biomatériaux optimaux doivent contenir une surface élevée pour l'adhésion cellulaire, soutenir l'intégrité mécanique du tissu, minimiser les distances de diffusion et se dégrader une fois qu'il n'y a plus besoin de support structurel (Rosso *et al.*, 2004). Les structures sont obtenues à partir de sources naturelles (c'est-à-dire de la MEC) ou créées par des moyens artificiels à l'aide de matériaux synthétiques tels que la poly-L-lactique, le polylactique-glycolique et le poly-uréthane. Le principal avantage des structures synthétiques par rapport aux matériaux d'origine naturelle réside dans le fait qu'elles peuvent être caractérisées et fabriquées avec précision et avec un grand contrôle sur leurs propriétés physiques et chimiques. Des dispositifs hybrides ont également été testés comme matériaux spécifiques pour la génération de tissu musculaire (Hong *et al.*, 2012 ; Wolf *et al.*, 2015).

Les trois principaux types de matériaux utilisés pour la production de faisceaux de myofibres sont successivement présentés ci-dessous avant la présentation des protocoles de bio-ingénierie développés pour augmenter la maturation et la fonctionnalité du muscle squelettique modifié.

■ 3.1. Matériau à base de protéines natives de la MEC

Les interactions entre les cellules et la MEC (principalement collagène I-IV, fibrinogène, laminine et glyco-aminoglycanes ainsi qu'un assortiment de facteurs de croissance) contribuent aux processus cellulaires critiques au

cours de la croissance et de la régénération musculaires. De plus, il a été démontré que les hydrogels d'origine naturelle (collagène, fibrine, Matrigel) supportent bien la haute densité et la propagation 3D des cellules musculaires murines C2C12 (Okano et Matsuda, 1997), l'alignement cellulaire unidirectionnel par l'application de contraintes géométriques (Bian et Bursac, 2009) et les contractions macroscopiques des tissus (Yamamoto *et al.*, 2011). Les protéines natives de la MEC dérivées du muscle squelettique ont été largement utilisées dans le passé en tant que composant de matériau de structure 3D. À titre d'exemple, le laboratoire de Bursac a testé différents types de protéines matricielles (collagène I/fibrinogène/Matrigel) avec différentes concentrations d'hydrogel contenant des faisceaux de muscles squelettiques néonataux de Rat pour évaluer leur impact respectif sur la structure tissulaire, leur capacité à se contracter et à capter le calcium intracellulaire (Hinds *et al.*, 2011). Le tissu musculaire modifié a été préparé sur la base d'une technique de moulage dans de l'hydrogel initialement développée par Rhim *et al.* (Rhim *et al.*, 2007). Des moules pour la fabrication de tissu ont été générés en éliminant longitudinalement une section de 25 mm de long d'un tube en silicone de 4,7 mm de diamètre et en scellant les deux extrémités avec un petit morceau de polydiméthylsiloxane (PDMS). Les moules ont été stérilisés à l'éthanol, immergés dans une solution de pluronic F-127 à 0,2 % (p/v) pour empêcher l'adhérence du gel, séchés à l'azote et placés dans une boîte de culture standard à 6 puits. Les languettes Velcro, qui servaient de sites de fixation du gel et permettaient la génération d'une tension longitudinale passive dans les faisceaux, ont été stérilisées à l'éthanol et fixées aux deux extrémités du moule avec des broches en acier inoxydable. Après le début de la polymérisation du gel de fibrine, par ajout de thrombine, un mélange de cellules/solution de gel a été injecté dans le moule en silicone et incubé à 37 °C jusqu'à la gélification. Les faisceaux de cellules/gel polymérisés ont ensuite été maintenus dans un milieu de croissance pendant 5 jours, puis basculés dans un milieu de différenciation sérique faible.

Après deux semaines de culture, les faisceaux musculaires étaient constitués de fibres musculaires hautement alignées et striées et capables de se contracter. L'utilisation de la fibrine a donné une amplitude isométrique plus élevée que celles mesurées dans les faisceaux à base de collagène I. L'ajout de Matrigel aux hydrogels de collagène a amélioré la structure musculaire modifiée, tandis qu'une teneur élevée en collagène a eu des effets délétères sur la maturation musculaire. Des concentrations plus élevées de fibrine et de Matrigel ont produit de manière synergique une augmentation supplémentaire de la force de contraction. Contrairement au collagène qui a été initialement utilisé par la plupart des laboratoires, la fibrine a été présentée comme le meilleur choix en tant que matrice pour l'ingénierie tissulaire du muscle squelettique de rat en raison de sa capacité à être largement remodelée et dégradée (Grassl *et al.*, 2002 ; Ross et Tranquillo, 2003) ainsi que sa raideur comparable à celle du muscle natif (Collet *et al.*, 2005 ; Yang *et al.*, 2007). Chez le bovin, elle favorise l'angiogenèse et l'extension des neurites, ce qui est essentiel pour la formation d'un muscle modifié entièrement fonctionnel pour des applications *in vivo* (Dietrich et Lelkes, 2006).

■ 3.2. Hydrogel de fibrine

En 2015, le laboratoire de Bursac a généré le premier système de culture biomimétique du muscle squelettique humain (« *myobundle* ») en utilisant des cellules coulées dans une matrice de fibrine/Matrigel et ancrées sur des cadres en nylon (Maffioletti *et al.*, 2018). Les myobundles ont commencé à se contracter spontanément après 3 à 5 jours de culture et contenaient des myofibres densément emballées et alignées entourées à la périphérie des fibroblastes après 2 semaines de culture. La structure mature des myofibres était caractérisée par l'expression du CMH, des stries croisées et de multiples noyaux myogénine +. D'un point de vue fonctionnel, les récepteurs de l'acétylcholine (AChR) étaient également présents à la surface des myofibres. Une fraction des cellules a continué à exprimer le marqueur des CS, Pax7, suggérant une capacité de

régénération telle que décrite précédemment dans un modèle de culture chez le Rat (Juhas *et al.*, 2016). De la même manière, le laboratoire de Gilbert a démontré une amélioration de la maturation des fibres et de l'expression de l'AChR suite à la différenciation myogénique en culture 3D (Afshar Bakooshli *et al.*, 2019). Les auteurs ont produit des progéniteurs myogéniques primaires et des cellules CD56- (type fibroblastes) provenant de biopsies humaines et les ontensemencées à des concentrations différentes de fibrine/hydrogel Geltrex, Geltrex (2D) ou fibrinogène/mélange Geltrex. Des hydrogels chargés de cellules musculaires ont été formés dans un canal PDMS et ancrés à chaque extrémité du canal aux crochets en nylon du tissu Velcro, qui agissent comme des tendons artificiels et établissent une tension uni-axiale lors du remodelage et de la différenciation des tissus 3D. Alors que les cultures de fibres musculaires 2D étaient alignées régionalement mais globalement désorganisées, un alignement uniforme des fibres musculaires striées a été déterminé le long de l'axe de tension dans les tissus 3D. Contrairement aux fibres musculaires établies dans les cultures 2D, celles dérivées de la culture 3D ont progressivement augmentées de diamètre au cours des 3 semaines de culture tout en maintenant l'alignement des fibres et une structure contractile assemblée. De plus, une augmentation de l'expression des isoformes adultes rapides et lentes du CMH a été notée, suggérant une maturation structurelle progressive du sarcomère. Les tissus musculaires humains 3D étaient capables de générer une force active dès 10 jours de différenciation, comme en témoignent les contractions spontanées, qui n'ont pas été observées dans les cultures 2D. La stimulation de l'ACh a produit une réponse immédiate au téтанos dans les tissus 3D suggérant une abondance d'AChR actifs, tandis que la réponse des cultures de fibres musculaires 2D était significativement moindre et entraînait inévitablement des dommages aux fibres musculaires.

Maffioletti *et al.* ont différencié des cellules myogéniques humaines dérivées de cellules pluripotentes (de patients sains et dystrophiques) dans

des hydrogels de fibrine (Moroni *et al.*, 2018), en adaptant les travaux réalisés par une plate-forme d'ingénierie tissulaire cardiaque pour orienter les cellules le long d'un axe (Hansen *et al.*, 2010). Après 10 jours de culture, les cellules ont généré une bande de tissu de 7 à 8 mm de long contenant des structures qui ressemblaient à des fibres musculaires squelettiques. De même, dans des conditions de culture 3D optimisées, ils ont démontré que les progéniteurs myogéniques dérivés de plusieurs lignées de cellules souches pluripotentes humaines forment de manière reproductible des faisceaux de tissus musculaires squelettiques fonctionnels contenant des myotubes multinucléés alignés. Les faisceaux présentaient une maturation structurale et moléculaire accrue, une hypertrophie et une capacité de contraction pendant 4 semaines *in vitro*. Après implantation dans le muscle des membres postérieurs de souris immunodéprimées, ces faisceaux ont montré une capacité à survivre, à se vasculariser progressivement et à maintenir leur fonctionnalité (Rao *et al.*, 2018). La formation *in vitro* de tels faisceaux représente une plate-forme microphysiologique intéressante pour la modélisation des maladies musculaires humaines et le développement de médicaments. En accord avec ces résultats, d'autres études ont confirmé que l'utilisation de l'environnement 3D est associée à des temps de culture plus longs, une augmentation de la taille des myotubes, une augmentation de la teneur en protéines et une amélioration de la maturation de l'expression des gènes du CMH par rapport aux cultures 2D.

■ 3.3. Hydrogel de gélatine méthacrylate

Hosseini *et al.* ont déterminé qu'un hydrogel de gélatine méthacrylée à micromotifs (GelMA) était un substrat approprié pour aligner les myoblastes issus de la lignée cellulaire C2C12 et pour générer du tissu musculaire squelettique fonctionnel (Hosseini *et al.*, 2012). La solution GelMA a été préparée à partir de la dissolution de la gélatine de type A dans l'anhydride méthacrylique. Pour générer des hydrogels GelMA micromoulés, elle a été versée

dans une boîte de Pétri en polystyrène, puis un tampon en PDMS correspondant à un moule photorésistant d'un motif de rainures de 100 µm/arêtes de 50 µm a été appliqué. Le motif, réalisé sur une plaquette de silicium par une technique de photolithographie classique (Carosio *et al.*, 2011 ; García-Prat *et al.*, 2013), mesurait 50 µm de hauteur et couvrait une surface de 1 cm². Le motif GelMA a ensuite été photoréticulé sous UV et le tampon PDMS a été délicatement retiré. Les myoblastes C2C12 qui ont été cultivés sur les hydrogels GelMA à micromotifs étaient significativement plus alignés au jour 3 de la culture que les cellules témoins cultivées sur des hydrogels sans motif. Les hydrogels GelMA ont été présentés comme des matériaux à haute performance pour le développement de l'ingénierie tissulaire en permettant aux cellules cultivées de migrer, de proliférer et de se mettre en contact les unes avec les autres. De plus, leurs propriétés mécaniques sont ajustables et leur capacité de diffusion élevée à travers leurs pores est avantageuse pour la nutrition cellulaire et l'élimination des déchets.

■ 3.4. Méthodes pour augmenter la maturation et la fonction des muscles squelettiques modifiés

a. Stimulations électriques et mécaniques

Bien que les myobundles miment de nombreuses caractéristiques morphologiques et fonctionnelles du muscle squelettique natif, leur taille et leurs propriétés contractiles isométriques sont cependant inférieures à celles du muscle adulte natif, révélant une maturation musculaire incomplète (Madden *et al.*, 2015 ; Roche *et al.*, 2015). Sous stimulation électrique prolongée, la culture primaire de myoblastes (humains, lapins et souris) sur des micromodèles de fibrine ou d'acide polylactique présente une formation accrue de myotubes et un taux de différenciation plus élevé (Pedrotty *et al.*, 2005 ; Flaibani *et al.*, 2009). De plus, une augmentation de la maturation et de la force du myobundle a été établie chez les rongeurs (Huang *et al.*, 2006 ; Donnelly *et al.*, 2010) et l'Homme (Khodabukus *et*

Baar, 2009) dans des tissus musculaires conçus en 3D. Pour cela, une stimulation électrique a été réalisée entre les semaines 1 et 2 de différenciation du myobundle en utilisant des périodes de stimulation d'une heure séparées par des repos de 7 heures. Plus précisément, les myobundles ont été stimulés électriquement en continu à 1 Hz ou avec un train d'impulsions de 0,5 sec, 10 Hz toutes les 5 sec, délivrant ainsi la même quantité totale d'impulsions de stimulation. L'utilisation de protocoles de chargement cyclique ou d'étirement a révélé que la stimulation mécanique induit également une hypertrophie musculaire et une teneur en protéines (Powell *et al.*, 2002) ainsi qu'une augmentation de la différenciation et de la fonction musculaires modifiées chez l'homme (Handschin *et al.*, 2015).

b. Systèmes de co-culture

Pour améliorer la formation de tissus musculaires matures avec des fonctionnalités plus élevées, différents systèmes de co-culture ont été développés dans des protocoles de bio-ingénierie. Les myoblastes C2C12 cultivés dans des hydrogels GelMa microstructurés avec des cellules neurales PC12 ont montré une différenciation améliorée avec une formation, un alignement et une longueur de myotube améliorés (Ostrovidov *et al.*, 2017). Au niveau moléculaire, une augmentation d'expression des marqueurs spécifiques de la différenciation musculaire, de la maturation et des jonctions neuromusculaires a également été observée. Une meilleure organisation vasculaire a été établie en tri-culture composée de myoblastes, de fibroblastes et de cellules endothéliales (Koffler *et al.*, 2011). D'autres études, utilisant une co-culture de C2C12 et de cellules endothéliales, ont montré le développement de tissu prévascularisé avec formation d'un réseau capillaire, permettant une anastomose fonctionnelle rapide lors de la transplantation (Sasagawa *et al.*, 2010). La jonction neuromusculaire est une synapse hautement organisée formée entre un axone motoneuronal et une fibre musculaire, qui est responsable de la transmission des signaux efférents des motoneurons projetés aux fibres musculaires afin d'activer la contraction des fibres. En 2019, le laboratoire

de Gilbert a rapporté une méthode intégrant des repères architecturaux avec des techniques de co-culture pour créer un environnement propice à la formation de novo de jonctions neuromusculaires humaine adulte dès 2 semaines de culture. Les cultures de motoneurons ont été mélangées avec des progéniteurs myogéniques dans le mélange d'hydrogel et ensemencées ensemble dans les canaux PDMS. Après 10 jours en milieu de différenciation, les co-cultures se sont auto-organisées de telle sorte que les progéniteurs myogéniques fusionnent pour former des fibres musculaires multinucléées, alignées et striées avec des ensembles de motoneurons positionnés à la périphérie des faisceaux musculaires. L'analyse par Western Blot a confirmé l'expression des protéines MuSK et rapsyn, deux protéines synaptiques décisives dans la synaptogenèse induite par l'agrine. Des regroupements d'AChR plus nombreux et plus grands ont été observés dans les co-cultures 3D par rapport aux cultures musculaires 3D seules, en particulier aux sites où les neurites musculaires sont entrées en contact avec les fibres musculaires. Dans l'ensemble, dans des études où les fibres musculaires ont été cultivées côte à côte en 2D, les auteurs ont montré que le système de culture 3D permettait le maintien à long terme de la maturation des fibres musculaires en culture.

4. La bio-impression 3D, une autre stratégie pour générer des constructions fonctionnelles de tissus musculaires squelettiques

Au cours des dernières années, des techniques de bio-impression ont émergé pour produire des plateformes 3D avec ou sans cellules. Leurs principaux avantages reposent sur leur reproductibilité, leur adéquation, leur précision mais aussi sur la capacité de bio-ingénierie de diverses constructions tissulaires fonctionnelles avec une géométrie complexe en construisant des hydrogels chargés de cellules (couche par couche) (Moroni *et al.*, 2018). Plusieurs méthodes de micro-fabrication ont été développées pour

générer des structures biomimétiques pouvant ressembler à des tissus musculaires à l'échelle du micron, tels que les méthodes d'électrofilage ou electrospinning, de micromoulage, de photolithographie et de lithographie douce. En bref, l'électrofilage est une méthode largement appliquée dans la synthèse de structures d'ingénierie tissulaire car elle peut à la fois contrôler la taille et la morphologie des nanofibres en ajustant les paramètres techniques et utiliser presque tous les polymères et additifs solubles (Gilbert-Honick *et al.*, 2018 ; Soliman *et al.*, 2018). À l'aide d'un système d'électrofilage humide, une structure composite 3D contenant un cœur de fil de nanofibre aligné a été conçu (Wang *et al.*, 2015). Dans ce contexte, les myoblastes C2C12 ont montré un bon alignement et se sont correctement développés en formant des myotubes allongés en 3D. L'approche de micromoulage présente les avantages d'un temps de traitement court et de procédures faciles à utiliser avec la possibilité d'utiliser des élastomères pour la création de constructions tissulaires (Weinandy *et al.*, 2014). Il a été démontré que les substrats PDMS ondulés/à motifs sinusoïdaux permettaient aux myoblastes C2C12 de former des myotubes bien alignés après 6 jours de culture. Les mêmes résultats ont été obtenus sur des microfibrilles d'alginate avec des sites adhésifs de protéines de la MEC à motifs (fibronectine) générés à l'aide de micromoulage et d'un système d'impression par microcontact (Patil *et al.*, 2016). La photolithographie est un procédé permettant de transférer les caractéristiques géométriques d'un masque sur un substrat en utilisant une résine photosensible et une source lumineuse (Nakanishi *et al.*, 2008). Lorsque les résines photosensibles sont exposées à une irradiation UV avec ou sans masque optique, les motifs sont transférés du masque optique aux matériaux, permettant la production d'échafaudages pour l'ingénierie tissulaire (Albisetti *et al.*, 2016). La lithographie douce repose sur l'utilisation d'un tampon élastomère souple avec un motif dont plusieurs copies peuvent être préparées par procédé photolithographique, ce qui la rend plus pratique et moins chère que la photolithographie standard (Lindquist *et al.*, 2012).

Les méthodes de bio-impression 3D ont été largement étudiées au cours de la dernière décennie afin de superposer des cellules musculaires vivantes et des biomatériaux couche par couche pour permettre la croissance cellulaire et les signaux cellulaires grâce à la modulation de l'interaction cellule-cellule et de l'interaction cellule-matrice (Kang *et al.*, 2020). Ces méthodes constituent des technologies de fabrication puissantes pour l'ingénierie tissulaire car elles peuvent facilement recréer des tissus volumineux et complexes, pour doter les cellules d'un micro-environnement 3D biomimétique. Les méthodes conventionnelles peuvent être classées en trois groupes principaux de méthodes : jet d'encre, micro-extrusion et laser (Agarwala, 2016). Concernant la méthode jet d'encre, les approches les plus couramment utilisées pour imprimer de l'encre biologique sur un substrat sont les buses thermiques et piézoélectriques. La résolution des constructions imprimées peut cependant être limitée en raison du style d'injection de buse et des caractéristiques du matériau. Avec la méthode de micro-extrusion, les techniques généralement utilisées pour la dispersion des biomatériaux sur un substrat sont les distributeurs pneumatiques, à piston et à vis. La construction de grandes structures tissulaires de forme libre s'est révélée assez difficile en raison d'un problème de stabilité mécanique et de moyens d'impression inadéquats. La méthode assistée par laser a l'avantage d'être sans buse, ce qui peut éviter le colmatage observé avec les méthodes précédentes, mais est limitée par l'exigence d'une gélification d'hydrogel rapide pour obtenir des motifs imprimés à haute résolution, entraînant des débits faibles (Merceron *et al.*, 2015). Récemment, une optimisation des encres biologiques a été opérée pour augmenter leurs propriétés physico-chimiques avant, pendant et après l'impression 3D, ce qui est apparu essentiel pour assurer le succès de la bio-impression 3D (Mredha *et al.*, 2018). Par rapport à tous ces développements de structures tissulaires 3D à partir d'hydrogels, une structure alignée/micro-topographique *in situ* a récemment été produite en utilisant une MEC décellularisée (dECM) comme composant biochimique et un

processus d'impression cellulaire 3D modifié. La dECM a été dérivée de la décellularisation des muscles squelettiques porcins et modifiée chimiquement par un procédé au méthacrylate pour améliorer la stabilité mécanique. Après l'ensemencement dans cette structure sans hydrogel, les myoblastes C2C12 se sont alignés et différenciés pour générer un pourcentage élevé de formation de myotubes. Un autre type d'encres biologiques à base d'ECM spécifique au tissu musculaire a été présenté pour induire efficacement la différenciation cellulaire et le développement tissulaire (Choi *et al.*, 2016). En effet, par rapport aux constructions conventionnelles imprimées de collagène, cette nouvelle encres biologique a contribué à améliorer significativement la prolifération cellulaire, une plus grande expression des gènes myogéniques ainsi qu'une formation de myotubes plus matures caractérisée par la présence d'un motif de bande striée et d'une contraction en réponse à la stimulation électrique.

Dans l'ensemble, ces résultats ont démontré que l'utilisation d'encres biologiques avec la technologie d'impression cellulaire 3D pourrait fournir un micro-environnement myogénique et une architecture appropriée pour mimer le tissu musculaire natif.

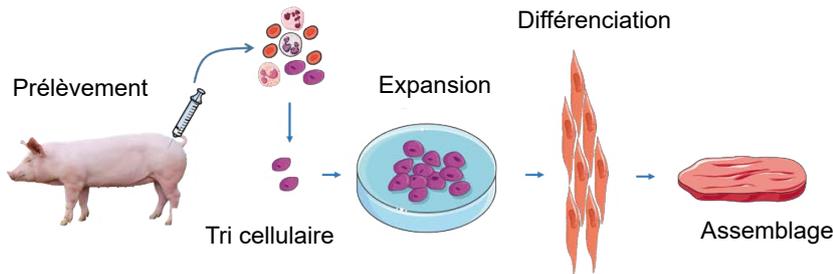
5. Utilisation des modèles *in vitro* de tissus musculaires pour l'étude des animaux d'élevage et perspectives d'application

Le vieillissement affecte négativement la régénération musculaire et le potentiel des cellules souches musculaires, entraînant une paupérisation des tissus musculaires ou une sarcopénie (García-Prat, Sousa-Victor et Muñoz-Cánoves, 2013). Plusieurs études ont montré que les CS âgées présentaient des altérations fonctionnelles, parmi lesquelles la capacité à s'activer, proliférer et à se différencier (Conboy *et al.*, 2003). Chez le Porc, une structure en hydrogel à base de Poly-Éthylène Glycol (PEG) a été utilisée pour compléter les données sur l'impact du vieillissement sur l'efficacité de la régénération

tissulaire (Fuoco *et al.*, 2014). Ainsi, des péricytes adultes dérivés de muscles squelettiques, connus pour contribuer au processus de régénération, ont été isolés à partir de jeunes porcelets et de porcs adultes (sangliers). La suspension cellulaire a été mélangée avec une solution de fibrinogène poly-éthylène glycosylé (F-PEG), ajoutée dans des moules cylindriques en silicone et placée sous une lampe UV à ondes longues pour permettre la transition du F-PEG en gel. La F-PEG a été décrite comme ayant une influence majeure sur la différenciation des progéniteurs myogéniques en fournissant un micro-environnement 3D adapté au développement des fibres musculaires. Le milieu de culture a ensuite été ajouté immédiatement aux hydrogels polymérisés pour assurer la croissance cellulaire. Les « bouchons » ont été cultivés pendant 24 h dans du milieu de croissance supplémenté en sérum puis transférés dans un milieu de différenciation appauvri en sérum pendant 5 jours afin de favoriser la formation de fibres musculaires. *In vitro*, les péricytes des porcs adultes avaient une morphologie et une capacité de formation de colonies similaires à celles des porcelets, mais une capacité altérée à former des myotubes et des structures de type capillaire. Fait intéressant, il a également été démontré que l'utilisation d'une structure d'hydrogel à base de PEG pour soutenir les péricytes adultes améliorerait considérablement leur différenciation myogénique et leur potentiel angiogénique *in vitro* et *in vivo*, en créant une niche appropriée pour favoriser la régénération des muscles squelettiques et la croissance des vaisseaux sanguins.

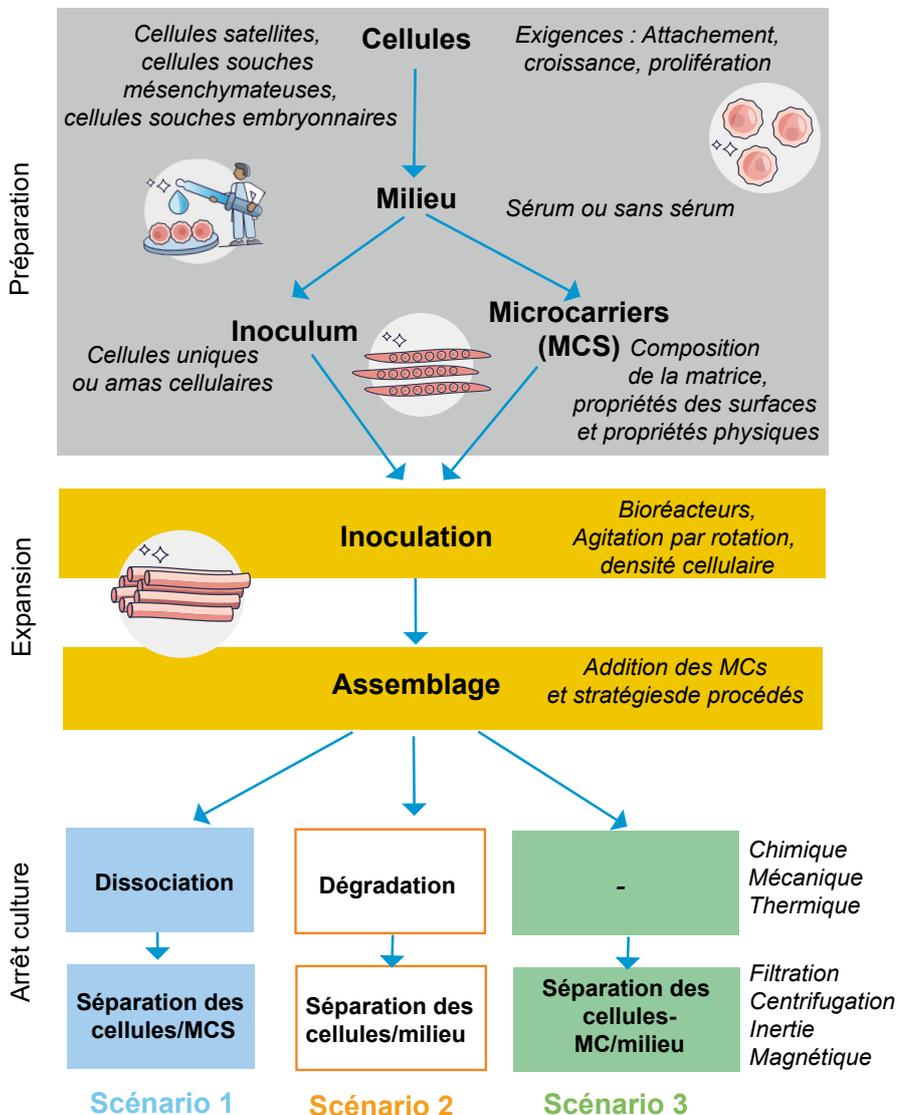
Plusieurs méthodes de production de viande « cultivée » ont été proposées et différents types de cellules ont été considérées, notamment les cellules souches embryonnaires, les cellules souches pluripotentes induites, les cellules souches mésenchymateuses et les CS (Post, 2012). Pour la viande « cultivée » en 3D, les cellules sont cultivées dans des structures qui permettent la hiérarchisation cellulaire et leur développement. La structure 3D idéale devant être comestible, il n'est donc pas nécessaire de la retirer après culture. De plus, le muscle produit doit conserver

Figure 3. Principales étapes nécessaires à la production de viande « cultivée » à partir d'une biopsie animale.



Les cellules satellites sont isolées à partir d'une biopsie musculaire animale puis ensemencées *in vitro* pour proliférer. Lorsqu'une quantité suffisante de myoblastes est obtenue, leur différenciation est induite. Les myotubes résultants commencent à produire des protéines pour former des myocytes fonctionnels qui peuvent ensuite être assemblés selon des procédés alimentaires connus (mélange, moulage) pour former de la viande « cultivée ». D'après Dessauge *et al.* (2021).

Figure 4. Processus et scénarios pour les bioprocédés à base de microcarriers (MC).



Les MC servent de substrat temporaire pour la fixation et la prolifération des cellules et doivent donc être séparés des cellules à un certain stade du bioprocédé. Les microcarriers servent de substrat temporaire pour la prolifération cellulaire mais sont dégradés ou dissous au cours du bioprocédé. Ils sont incorporés dans le produit final et doivent donc être comestibles (d'après Post (2012) et Dessauge *et al.* (2021)).

une souplesse pour ne pas se détacher des myotubes en développement et favoriser la vascularisation (figure 3).

Les cellules souches musculaires bovines semblent les candidats les simples et les plus appropriés à la culture de viande *in vitro* (figure 4). Les avantages potentiels des microcarriers (MC) à utiliser pour la production de viande peuvent être considérés selon trois scénarios différents. Dans le scénario 1, les MC sont utilisés comme substrats temporaires pour l'expansion des CS et doivent être retirés à la fin du processus. Il existe deux conditions préalables importantes dans ce cas, à savoir la nécessité pour les MC de fournir un rendement de détachement élevé et une séparation facile des cellules. Concernant le scénario 2, les MC servent également de substrat temporaire pour l'expansion des CS mais au lieu d'être séparés à la fin du processus, comme cela a été fait dans le scénario 1, ils peuvent être dégradés lors d'une étape préalable. Dans ce cas, l'étape de dissociation peut être remplacée par une étape de dégradation du MC pour obtenir une suspension cellulaire unique. Enfin, dans le scénario 3, les MC sont composés de matériaux comestibles et peuvent donc être intégrés dans le produit final. Contrairement au scénario précédent où les MC sont considérés comme des matériaux en contact avec les aliments, ils doivent être ici conformes aux réglementations pour une utilisation en tant qu'ingrédient ou additif alimentaire. En effet, en plus de favoriser la croissance cellulaire, un MC comestible pourrait également faire partie du produit final et affecter les attributs sensoriels du produit carné, tels que le goût, la couleur ou la texture. Afin de ressembler davantage au produit naturel, la société israélienne nommée MeaTech a proposé d'utiliser une technique d'impression 3D dans le but d'améliorer la texture de la viande « cultivée ».

Conclusion

La réussite des cultures 3D est considérablement dépendante de l'espèce étudiée et de la technique choisie. Dans l'ensemble, l'utilisation *in vitro* modèles

3D pour le tissu musculaire squelettique peut être considérée comme très intéressante dans quatre domaines d'application : *i*) la caractérisation approfondie des progéniteurs myogéniques dans un

large éventail d'espèces, notamment le Porc, la volaille et le Poisson pour étudier la notion de diversité cellulaire résidente dans les tissus ; *ii*) une meilleure compréhension des dérégulations

affectant les progéniteurs myogéniques chez les espèces de production et *iii*) la mise à disposition d'un modèle d'étude pour le processus de maturation de la viande.

Références

- Afshar Bakooshi M., Lippmann E.S., Mulcahy B., Iyer N., Nguyen C.T., Tung K., Stewart B.A., van den Dorpel H., Fuehrmann T., Shoichet M., Bigot A., Pegoraro E., Ahn H., Ginsberg H., Zhen M., Ashton R.S., Gilbert P.M., 2019. A 3D culture model of innervated human skeletal muscle enables studies of the adult neuromuscular junction. *eLife*, 8:e44530. <https://doi.org/10.7554/eLife.44530>
- Agarwala S., 2016. A Perspective on 3D Bioprinting Technology: Present and Future. *Am. J. Eng. Appl. Sci.*, 9, 985-990. <https://doi.org/10.3844/ajeassp2016.985.990>
- Albisetti E., Carroll K.M., Lu X., Curtis J.E., Petti D., Bertacco R., Riedo E., 2016. Thermochemical scanning probe lithography of protein gradients at the nanoscale. *Nanotechnology*, 27, 315302. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/27/31/315302>
- Arsic N., Mamaeva D., Lamb N.J., Fernandez A., 2008. Muscle-derived stem cells isolated as non-adherent population give rise to cardiac, skeletal muscle and neural lineages. *Exp. Cell Res.*, 314, 1266-1280. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2008.01.009>
- Bérard J., Kalbe C., Lösel D., Tuchscherer A., Rehfeldt C., 2011. Potential sources of early-postnatal increase in myofibre number in pig skeletal muscle. *Histochem. Cell Biol.*, 136, 217-225. <https://doi.org/10.1007/s00418-011-0833-z>
- Bhatia S.N., Ingber D.E., 2014. Microfluidic organs-on-chips. *Nature Biotechnol.*, 32, 760-772. <https://doi.org/10.1038/nbt.2989>
- Bian W., Bursac N., 2009. Engineered skeletal muscle tissue networks with controllable architecture. *Biomaterials*, 30, 1401-1412. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.11.015>
- van den Brink S.C., Sage F., Vértsey Á., Spanjaard B., Peterson-Maduro J., Baron C.S., Robin C., van Oudenaarden A., 2017. Single-cell sequencing reveals dissociation-induced gene expression in tissue subpopulations. *Nature Methods*, 14, 935-936. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4437>
- Carosio S., Berardinelli M.G., Aucello M., Musarò A., 2011. Impact of ageing on muscle cell regeneration. *Ageing Res. Rev.*, 10, 35-42. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2009.08.001>
- Choi Y.J., Kim T.G., Jeong J., Yi H.G., Park J.W., Hwang W., Cho D.W., 2016. 3D Cell Printing of Functional Skeletal Muscle Constructs Using Skeletal Muscle-Derived Bioink. *Adv. Healthcare Mat.*, 5, 2636-2645. <https://doi.org/10.1002/adhm.201600483>
- Collet J.P., Shuman H., Ledger R.E., Lee S., Weisel J.W., 2005. The elasticity of an individual fibrin fiber in a clot. *Proc. Nat. Academy Sci., United States of America* 102, 9133-9137. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504120102>
- Conboy I.M., Conboy M.J., Smythe G.M., Rando T.A., 2003. Notch-mediated restoration of regenerative potential to aged muscle. *Science*, 302, 1575-1577. <https://doi.org/10.1126/science.1087573>
- Dennis R.G., Kosnik P.E., 2000. Excitability and isometric contractile properties of mammalian skeletal muscle constructs engineered *in vitro*. *In Vitro Cellular Dev. Biol., Anim.*, 36, 327-335. [https://doi.org/10.1290/1071-2690\(2000\)036<0327:EAICPO>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1290/1071-2690(2000)036<0327:EAICPO>2.0.CO;2)
- Dessauge F., Schleder C., Perruchot M.H., Rouger K., 2021. 3D *in vitro* models of skeletal muscle: myosphere, myobundle and bioprinted muscle construct. *Vet. Res.*, 52, 72. <https://doi.org/10.1186/s13567-021-00942-w>
- Dietrich F., Lelkes P.I., 2006. Fine-tuning of a three-dimensional microcarrier-based angiogenesis assay for the analysis of endothelial-mesenchymal cell co-cultures in fibrin and collagen gels. *Angiogenesis*, 9, 111-125. <https://doi.org/10.1007/s10456-006-9037-x>
- Donnelly K., Khodabukus A., Philp A., Deldicque L., Dennis R.G., Baar K., 2010. A novel bioreactor for stimulating skeletal muscle *in vitro*. *Tissue Eng., Part C*, 16, 711-718. <https://doi.org/10.1089/ten.TEC.2009.0125>
- Dumont N.A., Bentzinger C.F., Sincennes M.C., Rudnicki M.A., 2015. Satellite Cells and Skeletal Muscle Regeneration. *Compr. Physiol.*, 5, 1027-1059. <https://doi.org/10.1002/cphy.c140068>
- Eberli D., Soker S., Atala A., Yoo J.J., 2009. Optimization of human skeletal muscle precursor cell culture and myofiber formation *in vitro*. *Methods*, 47, 98-103. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2008.10.016>
- Flaibani M., Boldrin L., Cimetta E., Piccoli M., De Coppi P., Elvassore N., 2009. Muscle differentiation and myotubes alignment is influenced by micropatterned surfaces and exogenous electrical stimulation. *Tissue Eng. Part A*, 15, 2447-2457. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2008.0301>
- Fuoco C., Salvatori M.L., Biondo A., Shapira-Schweitzer K., Santoleri S., Antonini S., Bernardini S., Tedesco F.S., Cannata S., Seliktar D., Cossu G., Gargioli C., 2012. Injectable polyethylene glycol-fibrinogen hydrogel adjuvant improves survival and differentiation of transplanted mesoangioblasts in acute and chronic skeletal-muscle degeneration. *Skeletal Muscle* 2, 24. <https://doi.org/10.1186/2044-5040-2-24>
- Fuoco C., Sangalli E., Vono R., Testa S., Sacchetti B., Latronico M.V.G., Bernardini S., Madeddu P., Cesareni G., Seliktar D., Rizzi R., Bearzi C., Cannata S.M., Spinetti G., Gargioli C., 2014. 3D hydrogel environment rejuvenates aged pericytes for skeletal muscle tissue engineering. *Frontiers Physiol.*, 5, 203. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00203>
- García-Prat L., Sousa-Victor P., Muñoz-Cánoves P., 2013. Functional dysregulation of stem cells during aging: a focus on skeletal muscle stem cells. *FEBS J.*, 280, 4051-4062. <https://doi.org/10.1111/febs.12221>
- Ghaemmaghami A.M., Hancock M.J., Harrington H., Kaji H., Khademhosseini A., 2012. Biomimetic tissues on a chip for drug discovery. *Drug Discovery Today*, 17, 173-181. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2011.10.029>
- Gilbert-Honick J., Ginn B., Zhang Y., Salehi S., Wagner K.R., Mao H.Q., Grayson W.L., 2018. Adipose-derived Stem/Stromal Cells on Electrospun Fibrin Microfiber Bundles Enable Moderate Muscle Reconstruction in a Volumetric Muscle Loss Model. *Cell Transplantation*, 27, 1644-1656. <https://doi.org/10.1177/0963689718805370>
- Guo X., Greene K., Akanda N., Smith A., Stancescu M., Lambert S., Vandenburgh H., Hickman J., 2014. *In vitro* Differentiation of Functional Human Skeletal Myotubes in a Defined System. *Biomater. Sci.*, 2, 131-138. <https://doi.org/10.1039/C3BM60166>
- Grassl E.D., Oegema T.R., Tranquillo R.T., 2002. Fibrin as an alternative biopolymer to type-I collagen for the fabrication of a media equivalent. *J. Biomed. Materials Res.*, 60, 607-612. <https://doi.org/10.1002/jbm.10107>
- Handschin C., Mortezaei A., Plock J., Eberli D., 2015. External physical and biochemical stimulation to enhance skeletal muscle bioengineering. *Adv. Drug Delivery Rev.*, 168-175. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.10.021>
- Hansen A., Eder A., Bönstrup M., Flato M., Mewe M., Schaaf S., Aksehrioglu B., Schwoerer AP, Schwörer A, Uebeler J, Eschenhagen T., 2010. Development of a drug screening platform based on engineered heart tissue. *Circulation Res.*, 107, 35-44. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.211458>
- Hinds S., Bian W., Dennis R.G., Bursac N., 2011. The role of extracellular matrix composition in structure and function of bioengineered skeletal muscle. *Biomaterials*, 32, 3575-3583. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.01.062>
- Hong Y., Takanari K., Amoroso N.J., Hashizume R., Brennan-Pierce E.P., Freund J.M., Badylak S.F., Wagner

- W.R., 2012. An elastomeric patch electrospun from a blended solution of dermal extracellular matrix and biodegradable polyurethane for rat abdominal wall repair. *Tissue Eng. Part C, Methods* 18:122-132. <https://doi.org/10.1089/ten.TEC.2011.0295>.
- Hosseini V., Ahadian S., Ostrovidov S., Camci-Unal G., Chen S., Kaji H., Ramalingam M., Khademhosseini A., 2012. Engineered contractile skeletal muscle tissue on a microgrooved methacrylated gelatin substrate. *Tissue Eng., Part A* 18, 2453-2465. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2012.0181>.
- Huang Y.C., Dennis R.G., Baar K., 2006. Cultured slow vs. fast skeletal muscle cells differ in physiology and responsiveness to stimulation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 291, C11-17. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00366.2005>.
- Ikemoto M., Fukada S.I., Uezumi A., Masuda S., Miyoshi H., Yamamoto H., Wada M.R., Masubuchi N., Miyagoe-Suzuki Y., Takeda S., 2007. Autologous transplantation of SM/C-2.6(+) satellite cells transduced with micro-dystrophin CS1 cDNA by lentiviral vector into mdx mice. *Molecular Therapy: J. American Soc. Gene Therapy*, 15, 2178-2185. <https://doi.org/10.1038/sj.mt.6300295>.
- Janssen I., Heymsfield S.B., Wang Z.M., Ross R., 2000. Skeletal muscle mass and distribution in 468 men and women aged 18-88 yr. *J. Appl. Physiol.*, 89, 81-88. <https://doi.org/10.1152/jappl.2000.89.1.81>.
- Juhas M., Ye J., Bursac N., 2016. Design, evaluation, and application of engineered skeletal muscle. *Methods*, 99, 81-90. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.10.002>.
- Kang M.S., Lee S.H., Park W.J., Lee J.E., Kim B., Han D.W., 2020. Advanced Techniques for Skeletal Muscle Tissue Engineering and Regeneration. *Bioengineering*, 7:E99. <https://doi.org/10.3390/bioengineering7030099>.
- Khodabukus A., Baar K., 2009. Regulating fibrinolysis to engineer skeletal muscle from the c2c12 cell line. *Tissue Eng., Part C, Methods*, 15, 501-511. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2008.0286>.
- Koffler J., Kaufman-Francis K., Shandalov Y., Yulia S., Egozi D., Dana E., Pavlov D.A., Daria A.P., Landesberg A., Levenberg S., 2011. Improved vascular organization enhances functional integration of engineered skeletal muscle grafts. *Proc. Nat. Acad. Sci. United States of America*, 108, 14789-14794. <https://doi.org/10.1073/pnas.1017825108>.
- Lieber R.L., Fridén J., 2000. Functional and clinical significance of skeletal muscle architecture. *Muscle Nerve*, 23, 1647-1666. [https://doi.org/10.1002/1097-4598\(200011\)23:11<1647::aid-mus1>3.0.co;2-m](https://doi.org/10.1002/1097-4598(200011)23:11<1647::aid-mus1>3.0.co;2-m).
- Lindquist N.C., Nagpal P., McPeak K.M., Norris D.J., Oh S.H., 2012. Engineering metallic nanostructures for plasmonics and nanophotonics. *Reports Progress Physics. Physic. Soc.*, 75, 036501. <https://doi.org/10.1088/0034-4885/75/3/036501>.
- Liu J.Y., Swartz D.D., Peng H.F., Gugino S.F., Russell J.A., Andreadis S.T., 2007. Functional tissue-engineered blood vessels from bone marrow progenitor cells. *Cardiovascular Res.*, 75, 618-628. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2007.04.018>.
- Madden L., Juhas M., Kraus W.E., Truskey G.A., Bursac N., 2015. Bioengineered human myobundles mimic clinical responses of skeletal muscle to drugs. *eLife*, 4:e04885. <https://doi.org/10.7554/eLife.04885>.
- Maffioletti S.M., Sarcar S., Henderson A.B.H., Mannhardt I., Pinton L., Moyle L.A., Steele-Stallard H., Cappellari O., Wells K.E., Ferrari G., Mitchell J.S., Tyzack G.E., Kotiadis V.N., Khedr M., Ragazzi M., Wang W., Duchon M.R., Patani R., Zammit P.S., Wells D.J., Eschenhagen T., Tedesco F.S., 2018. Three-dimensional human ipsc-derived artificial skeletal muscles model muscular dystrophies and enable multilineage tissue engineering. *Cell Reports*, 23, 899-908. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.03.091>.
- Merceron T.K., Burt M., Seol Y.J., Kang H.W., Lee S.J., Yoo J.J., Atala A., 2015. A 3D bioprinted complex structure for engineering the muscle-tendon unit. *Biofabrication*, 7:035003. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/7/3/035003>.
- Mesires N.T., Doumit M.E., 2002. Satellite cell proliferation and differentiation during postnatal growth of porcine skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 282, C899-906. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00341.2001>.
- Mitchell K.J., Mitchell K.J., Pannérec A., Cadot B., Parlakian A., Besson V., Gomes E.R., Marazzi G., Sassooun D.A., 2010. Identification and characterization of a non-satellite cell muscle resident progenitor during postnatal development. *Nat. Cell Biol.*, 12, 257-266. <https://doi.org/10.1038/ncb2025>.
- Moroni L., Burdick J.A., Highley C., Lee S.J., Morimoto Y., Takeuchi S., Yoo J.J., 2018. Biofabrication strategies for 3D *in vitro* models and regenerative medicine. *Nature Rev. Materials*, 3, 21-37. <https://doi.org/10.1038/s41578-018-0006-y>.
- Mredha MdTI., Guo Y.Z., Nonoyama T., Nakajima T., Kurokawa T., Gong J.P., 2018. A Facile Method to Fabricate Anisotropic Hydrogels with Perfectly Aligned Hierarchical Fibrous Structures. *Adv. Materials* 30, 1704937. <https://doi.org/10.1002/adma.201704937>.
- Nakanishi J., Takarada T., Yamaguchi K., Maeda M., 2008. Recent advances in cell micropatterning techniques for bioanalytical and biomedical sciences. *Analyt. Sci., Intern. J. Japan Soc. Analytical Chem.*, 24, 67-72. <https://doi.org/10.2116/analsci.24.67>.
- Obokata H., Kojima K., Westerman K., Yamato M., Okano T., Tsuneda S., Vacanti C.A., 2011. The potential of stem cells in adult tissues representative of the three germ layers. *Tissue Eng., Part A*, 17, 607-615. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2010.0385>.
- Ogura Y., Shuichi S., Kurosaka M., Kotani T., Fujiya H., Funabashi T., 2020. Age-related decrease in muscle satellite cells is accompanied with diminished expression of early growth response 3 in mice. *Mol. Biol. Rep.*, 47, 977-986. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-05189-5>.
- Oh C.E., Antes K., Darby M., Song S., Starkschall G., 1999. Comparison of 2D conventional, 3D conformal, and intensity-modulated treatment planning techniques for patients with prostate cancer with regard to target-dose homogeneity and dose to critical, uninvolved structures. *Medical Dosimetry: Official J. American Assoc. Medical Dosimetrists*, 24, 255-263. [https://doi.org/10.1016/s0958-3947\(99\)00030-8](https://doi.org/10.1016/s0958-3947(99)00030-8).
- Okano T., Matsuda T., 1997. Hybrid muscular tissues: preparation of skeletal muscle cell-incorporated collagen gels. *Cell Transplantation*. 6, 109-118. [https://doi.org/10.1016/s0963-6897\(96\)00255-2](https://doi.org/10.1016/s0963-6897(96)00255-2).
- Ostrovidov S., Ahadian S., Ramon-Azcon J., Hosseini V., Fujie T., Parthiban S.P., Shiku H., Matsue T., Kaji H., Ramalingam M., Bae H., Khademhosseini A., 2017. Three-dimensional co-culture of C2C12/PC12 cells improves skeletal muscle tissue formation and function. *J. Tissue Engin. Regenerative Med.*, 11, 582-595. <https://doi.org/10.1002/term.1956>.
- Patil P., Szymanski J.M., Feinberg A.W., 2016. Defined Micropatterning of ECM Protein Adhesive Sites on Alginate Microfibers for Engineering Highly Anisotropic Muscle Cell Bundles. *Adv. Materials Technol.*, 1:1600003. <https://doi.org/10.1002/admt.201600003>.
- Pedrotty D.M., Koh J., Davis B.H., Taylor D.A., Wolf P., Niklason L.E., 2005. Engineering skeletal myoblasts: roles of three-dimensional culture and electrical stimulation. *American J. Physiol., Heart Circulatory Physiol.*, 288, H1620-1626. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00610.2003>.
- Penrose A., Westerman K.A., 2012. Sca-1 is involved in the adhesion of myosphere cells to $\alpha V\beta 3$ integrin. *Biology Open*, 1, 839-847. <https://doi.org/10.1242/bio.20121222>.
- Post M.J., 2012. Cultured meat from stem cells: Challenges and prospects. *Meat Sci.*, 92, 297-301. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.04.008>.
- Powell C.A., Smiley B.L., Mills J., Vandenberg H.H., 2002. Mechanical stimulation improves tissue-engineered human skeletal muscle. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.*, 283, C1557-1565. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00595.2001>.
- Rao L., Qian Y., Khodabukus A., Ribar T., Bursac N., 2018. Engineering human pluripotent stem cells into a functional skeletal muscle tissue. *Nature Comm.*, 9, 126. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02636-4>.
- Rhim C., Lowell D.A., Reedy M.C., Slentz D.H., Zhang S.J., Kraus W.E., Truskey G.A., 2007. Morphology and ultrastructure of differentiating three-dimensional mammalian skeletal muscle in a collagen gel. *Muscle Nerve*, 36, 71-80. <https://doi.org/10.1002/mus.20788>.
- Rizzi R., Bearzi C., Mauretti A., Bernardini S., Cannata S., Gargioli C., 2012. Tissue engineering for skeletal muscle regeneration. *Muscles, Ligaments and Tendons Journal* 2, 230.
- Roche S.M., Gumucio J.P., Brooks S.V., Mendias C.L., Clafflin D.R., 2015. Measurement of Maximum

Isometric Force Generated by Permeabilized Skeletal Muscle Fibers. *J. Visualized Exp., JoVE*:e52695. <https://doi.org/10.3791/52695>.

Ross J.J., Tranquillo R.T., 2003. ECM gene expression correlates with *in vitro* tissue growth and development in fibrin gel remodeled by neonatal smooth muscle cells. *Matrix Biology, J. Int. Society Matrix Biol.*, 22, 477-490. [https://doi.org/10.1016/S0945-053X\(03\)00078-7](https://doi.org/10.1016/S0945-053X(03)00078-7).

Rosso F., Giordano A., Barbarisi M., Barbarisi A., 2004. From cell-ECM interactions to tissue engineering. *J. Cellular Physiol.*, 199, 174-180. <https://doi.org/10.1002/jcp.10471>.

Sarig R., Baruchi Z., Fuchs O., Nudel U., Yaffe D., 2006. Regeneration and transdifferentiation potential of muscle-derived stem cells propagated as myospheres. *Stem Cells*, 24, 1769-1778. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0547>.

Sasagawa T., Shimizu T., Sekiya S., Haraguchi Y., Yamato M., Sawa Y., Okano T., 2010. Design of prevascularized three-dimensional cell-dense tissues using a cell sheet stacking manipulation technology. *Biomaterials*, 31, 1646-1654. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.11.036>.

Soliman E., Bianchi F., Sleigh J.N., George J.H., Cader M.Z., Cui Z., Ye H., 2018. Engineered method for

directional growth of muscle sheets on electrospun fibers. *J. Biom. Materials Res., Part A*, 106, 1165-1176. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36312>.

Vandenburgh H.H., 1988. A computerized mechanical cell stimulator for tissue culture: effects on skeletal muscle organogenesis. *In Vitro Cellular Dev. Biol., J. Tissue Culture Assoc.*, 24, 609-619. <https://doi.org/10.1007/BF02623597>.

Wang L., Wu Y., Guo B., Ma P.X., 2015. Nanofiber Yarn/Hydrogel Core-Shell Scaffolds Mimicking Native Skeletal Muscle Tissue for Guiding 3D Myoblast Alignment, Elongation, and Differentiation. *ACS nano*, 9, 9167-9179. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b03644>.

Wei Y., Li Y., Chen C., Stoelzel K., Kaufmann A.M., Albers A.E., 2011. Human skeletal muscle-derived stem cells retain stem cell properties after expansion in myosphere culture. *Exper. Cell Res.*, 317, 1016-1027. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2011.01.019>.

Weinandy S., Laffar S., Unger R.E., Flanagan T.C., Loesel R., Kirkpatrick C.J., van Zandvoort M., Hermanns-Sachweh B., Dreier A., Klee D., Jockenhoevel S., 2014. Biofunctionalized microfiber-assisted formation of intrinsic three-dimensional capillary-like structures. *Tissue Eng., Part A*, 20, 1858-1869. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2013.0330>.

Westerman K.A., 2015. Myospheres are composed of two cell types: one that is myogenic and a second that is mesenchymal. *PLoS One*, 10:e0116956. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116956>

Westerman K.A., Penrose A., Yang Z., Allen P.D., Vacanti C.A., 2010. Adult muscle "stem" cells can be sustained in culture as free-floating myospheres. *Experim. Cell Res.*, 316, 1966-1976. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.03.022>.

Wolf M.T., Dearth C.L., Sonnenberg S.B., Lobo E.G., Badyak S.F., 2015. Naturally derived and synthetic scaffolds for skeletal muscle reconstruction. *Adv. Drug Delivery Rev.*, 84, 208-221. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.08.011>.

Yamamoto Y., Ito A., Fujita H., Nagamori E., Kawabe Y., Kamihira M., 2011. Functional evaluation of artificial skeletal muscle tissue constructs fabricated by a magnetic force-based tissue engineering technique. *Tissue Eng., Part A*, 17, 107-114. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2010.0312>.

Yang L., van der Werf K.O., Koopman B.F.J.M., Subramaniam V., Bennink M.L., Dijkstra P.J., Feijen J., 2007. Micromechanical bending of single collagen fibrils using atomic force microscopy. *J. Biom. Materials Res., Part A*, 82, 160-168. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31127>.

Résumé

Le muscle squelettique est organisé en faisceau de fibres musculaires de différentes tailles et parcouru par des réseaux vasculaires et nerveux. Les cellules satellites sont des cellules souches logées le long des fibres musculaires et sont à la base des progéniteurs myogéniques (myoblastes). Les cellules satellites peuvent être aisément extraites du muscle et cultivées. Les modèles typiques de culture en deux dimensions (2D) de cellules dérivées du muscle squelettique ne peuvent pas recréer complètement l'organisation et la fonction des tissus musculaires vivants, ce qui limite leurs utilités dans les études physiologiques approfondies. Le développement de modèles de culture 3D fonctionnels offre une opportunité unique pour mimer les tissus vivants et modéliser les maladies musculaires. À cet égard, ce nouveau type de modèles *in vitro* augmente significativement notre compréhension de l'implication des différentes populations cellulaires dans la formation du muscle squelettique et de leurs interactions, ainsi que les modalités de réponse d'un muscle pathologique à de nouvelles thérapies. Ce deuxième point pourrait conduire à l'identification de traitements efficaces. Dans cette synthèse, nous traitons des progrès significatifs qui ont été réalisés ces dernières années pour concevoir des structures ressemblant à des tissus musculaires, fournissant des outils utiles pour étudier le comportement des cellules souches résidentes. Nous nous intéressons plus particulièrement au développement de systèmes basés sur des « myosphères » et des faisceaux de fibres ou « myobundles » ainsi que sur les systèmes de bio-impression. Les protocoles de stimulation électrique/mécanique et les systèmes de co-culture développés pour améliorer le processus et les fonctionnalités de maturation des tissus seront également présentés. La formation de tissus musculaires biomimétiques représente une nouvelle technologie pour étudier la fonction et l'organisation spatiale des muscles squelettiques dans un grand nombre de contextes physiologiques, pathologiques et agronomiques.

Abstract

3D in vitro models of skeletal muscle: innovative approaches for animal science

Skeletal muscle is organized into bundles of muscle fibers of different sizes and penetrated by vascular and nervous networks. Satellite cells are stem cells located along muscle fibers and are the basis of myogenic progenitors (myoblasts). Satellite cells can be easily extracted from muscle and cultured. Typical two-dimensional (2D) culture models of skeletal muscle-derived cells cannot fully recapitulate the organization and function of living muscle tissues, restricting their usefulness in in-depth physiological studies. The development of functional 3D culture models offer a major opportunity to mimic the living tissues and to model muscle diseases. In this respect, this new type of in vitro model significantly increases our understanding of the involvement of the different cell types present in the formation of skeletal muscle and their interactions, as well as the modalities of response of a pathological muscle to new therapies. This second point could lead to the identification of effective treatments. Here, we report the significant progress that has been made in recent years to engineer muscle tissue-like structures, providing useful tools to investigate the behavior of resident cells. Specifically, we were interested in the development of myosphere- and myobundle-based systems as well as bioprinting constructs. The electrical/mechanical stimulation protocols and the co-culture systems developed to improve tissue maturation processes and functionalities are presented. The formation of these biomimetic engineered muscle tissues represents a new platform for the study of skeletal muscle function and spatial organization in a large number of physiological and pathological contexts.

DESSAUGE F., SCHLEDER C., PERRUCHOT M.-H., ROUGER K., 2023. Développement des modèles de culture cellulaire de muscle en 3D : de nouvelles opportunités pour les productions animales. In : Cellules souches et Organoïdes : réalités et perspectives. Taragnat C., Pain B. (Eds). Dossier, INRAE Prod. Anim., 36, 7626.

<https://doi.org/10.20870/productions-animales.2023.36.2.7626>



Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY 4.0).

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.fr>

La citation comme l'utilisation de tout ou partie du contenu de cet article doit obligatoirement mentionner les auteurs, l'année de publication, le titre, le nom de la revue, le volume, les pages et le DOI en respectant les informations figurant ci-dessus.