



HAL
open science

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

Frederic Dessauge, Cindy Schleder, Marie-Hélène Perruchot, Karl Rouger

► **To cite this version:**

Frederic Dessauge, Cindy Schleder, Marie-Hélène Perruchot, Karl Rouger. Développement des modèles de culture cellulaire de muscle en 3D : de nouvelles opportunités pour les productions animales. INRAE Productions Animales, 2023, 36 (2), pp.7626. <10.20870/productions-animales.2023.36.2.7626>. <hal-03960291>

HAL Id: hal-03960291

<https://hal.science/hal-03960291v1>

Submitted on 27 Jan 2023

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.



Distributed under a Creative Commons CC BY-NC-ND 4.0 - Attribution - Non-commercial use - No Derivative Works - International License

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

*Frédéric Dessauge*¹

*Cindy Schleder*²

*Marie-Hélène Perruchot*¹

*Karl Rouger*²

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

² PAnTher, INRAE, Oniris, 44307, Nantes, FranceAdresses

Courriel : marie-helene.perruchot@inrae.fr

35 **Résumé**

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

59 **Abstract**

60

61 ***3D in vitro models of skeletal muscle: innovative approaches for animal science***

62

63 Skeletal muscle is organized into bundles of muscle fibers of different sizes and penetrated by
 64 vascular and nervous networks. Satellite cells are stem cells located along muscle fibers and
 65 are the basis of myogenic progenitors (myoblasts). Satellite cells can be easily extracted from
 66 muscle and cultured. Typical two-dimensional (2D) culture models of skeletal muscle-derived
 67 cells cannot fully recapitulate the organization and function of living muscle tissues,
 68 restricting their usefulness in in-depth physiological studies. The development of functional
 69 3D culture models offers a major opportunity to mimic the living tissues and to model muscle
 70 diseases. In this respect, this new type of in vitro model significantly increases our
 71 understanding of the involvement of the different cell types present in the formation of
 72 skeletal muscle and their interactions, as well as the modalities of response of a pathological
 73 muscle to new therapies. This second point could lead to the identification of effective
 74 treatments. Here, we report the significant progresses that have been made the last years to
 75 engineer muscle tissue-like structures, providing useful tools to investigate the behavior of
 76 resident cells. Specifically, we were interested in the development of myosphere- and
 77 myobundle-based systems as well as the bioprinting constructs. The electrical/mechanical
 78 stimulation protocols and the co-culture systems developed to improve tissue maturation
 79 process and functionalities are presented. The formation of these biomimetic engineered

80 muscle tissues represents a new platform to study skeletal muscle function and spatial
 81 organization in large number of physiological and pathological contexts.
 82

83 **Chapeau**

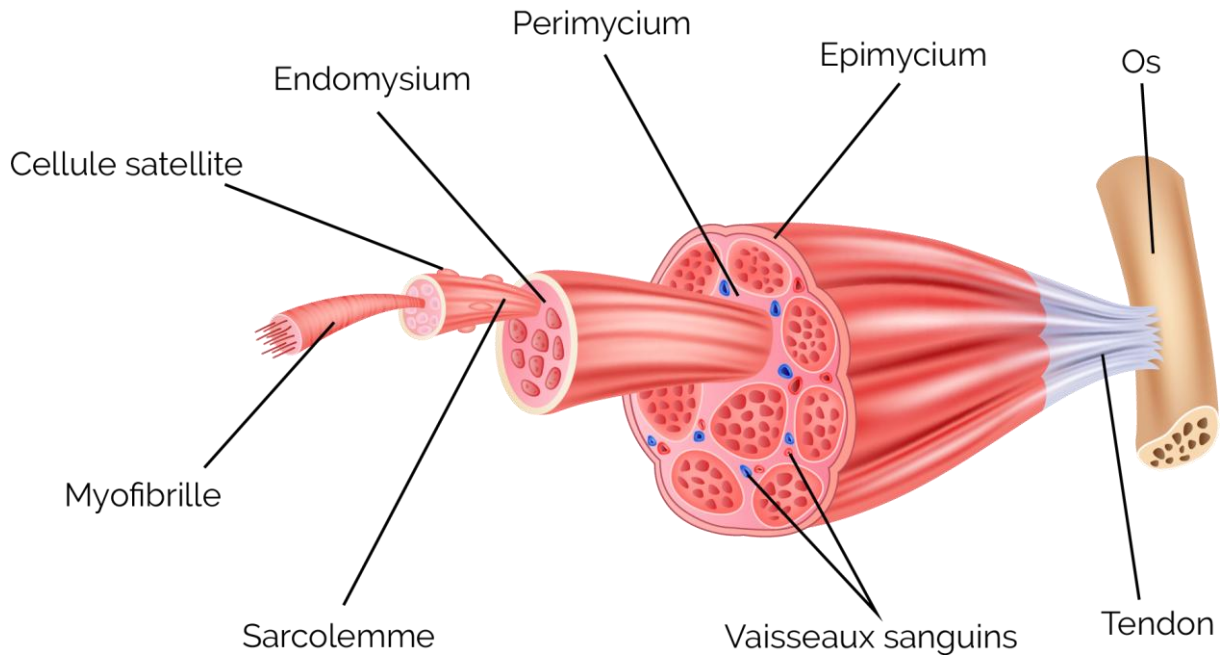
84 La culture de la viande in vitro a permis à la science d'accélérer ses connaissances sur la
 85 culture des cellules musculaires. D'énormes progrès sur les supports et les conditions de
 86 culture ont été faites pour ressembler le mieux possible à un muscle.
 87

88 **Introduction**

89
 90 Le muscle squelettique est le tissu le plus abondant, représentant 35 à 45 % de la masse
 91 corporelle totale (Janssen et al., 2000). Il fonctionne pour générer une force qui permet la
 92 locomotion, la posture, la déglutition et la respiration. Il est composé d'un mélange de fibres
 93 différenciées terminales qui représentent les unités contractiles de base regroupées en
 94 faisceaux (Figure 1). Chaque fibre musculaire squelettique est une cellule musculaire
 95 cylindrique unique. Un muscle squelettique individuel peut être constitué de centaines, voire
 96 de milliers, de fibres musculaires regroupées et enveloppées dans un revêtement de tissu
 97 conjonctif. Chaque muscle est entouré d'une gaine de tissu conjonctif appelée épimysium. Le
 98 fascia, tissu conjonctif extérieur à l'épimysium, entoure et sépare les muscles. Des portions de
 99 l'épimysium se projettent vers l'intérieur pour diviser le muscle en compartiments. Chaque
 100 compartiment contient un faisceau de fibres musculaires. Chaque faisceau de fibres
 101 musculaires est entouré d'une couche de tissu conjonctif appelée péri-mysium. Dans le
 102 faisceau, chaque cellule musculaire individuelle, appelée fibre musculaire, est entourée de
 103 tissu conjonctif appelé endomysium. Le revêtement de tissu conjonctif fournit un soutien et
 104 une protection aux cellules fragiles et leur permet de résister aux forces de contraction. Les
 105 revêtements fournissent également des voies pour le passage des vaisseaux sanguins et des
 106 nerfs. Généralement, l'épimysium, le péri-mysium et l'endomysium s'étendent au-delà de la
 107 partie charnue du muscle pour former un tendon épais en forme de corde ou une large
 108 aponévrose plate en forme de feuille. Le tendon et l'aponévrose forment des attaches
 109 indirectes des muscles au périoste des os ou au tissu conjonctif d'autres muscles.
 110 Généralement, un muscle s'étend sur une articulation et est attaché aux os par des tendons aux
 111 deux extrémités. Les muscles squelettiques sont abondants en vaisseaux sanguins et en nerfs.
 112 Ceci est directement lié à la fonction principale du muscle squelettique, la contraction. Avant
 113 qu'une fibre musculaire squelettique puisse se contracter, elle doit recevoir une impulsion
 114 d'une cellule nerveuse. Généralement, une artère et au moins une veine accompagnent chaque
 115 nerf qui pénètre dans l'épimysium d'un muscle squelettique. le développement du muscle, sa
 116 composition et sa capacité d'adaptation dépendent des cellules souches musculaires,
 117 principalement des cellules satellites (SATC). Les SATC jouent un rôle essentiel pour le
 118 développement musculaire ainsi que pour le maintien, la régénération et l'adaptation du tissu
 119 musculaire car elles sont capables de se différencier et de s'auto-renouveler (Mitchell et al.,
 120 2010; Dumont et al. , 2015). Les SATC adultes quiescentes sont situées dans une niche située
 121 entre le sarcolemme et la lame basale. Après un certain nombre de cycles prolifératifs, les
 122 SATC activées subissent une différenciation myogénique soit en fusionnant entre elles pour
 123 former de nouvelles myofibres soit avec des myofibres existantes (Bérard et al. , 2011). Par
 124 conséquent, le nombre de myonoyaux sous-laminaux diminue continuellement au cours de la
 125 croissance et reste relativement constant dans le muscle adulte (Rouger et al., 2004). En plus

126 d'une diminution du nombre de SATC au cours de la vie, une perte progressive de la capacité
 127 des cellules souches à se différencier survient avec l'âge et engendre des maladies chroniques
 128 chez les mammifères (Ogura et al., 2020). Dans les muscles malades et âgés, les myofibrilles
 129 sont progressivement remplacées par du tissu adipeux et fibreux tandis que les fibres restantes
 130 diminuent en masse. Il a été montré chez le porc que dans la première semaine de vie, 30%
 131 des SATC sont capables de se différencier puis cette proportion diminue de la semaine 7
 132 (14%) à la semaine 21 (9%) (Mesires et Doumit, 2002). Il est ainsi admis que seules certaines
 133 SATC se différencient et fusionnent par la suite avec les myofibrilles existantes, tandis que
 134 d'autres forment un pool de cellules réserves/souches crucial pour le maintien et la
 135 régénération du muscle.

136



137
 138
 139

140 Figure 1 : Structure d'un muscle squelettique (adobe stock)
 141

142 1. Limites des cultures 2D et intérêt des tissus musculaires 143 squelettiques issus de la bio-ingénierie 144

145 La culture cellulaire conventionnelle en deux dimensions (2D) repose sur l'adhérence à une
 146 surface plane, généralement une boîte de Pétri en verre ou en polystyrène, pour fournir un
 147 support mécanique aux cellules. La croissance cellulaire en monocouche 2D permet d'accéder
 148 à une quantité similaire de nutriments et de facteurs de croissance présents dans le milieu, ce
 149 qui entraîne une prolifération homogène, dans des conditions hautement contrôlées. Dans les
 150 systèmes 2D, des cultures primaires de myoblastes ont été développées chez de nombreuses
 151 espèces comme le Singe, le Porc, le Bovin, le Poulet et le Poisson. Si de telles cultures sont
 152 bien connues et contrôlées, elles présentent en retour plusieurs limites critiques, parmi
 153 lesquelles une non-durabilité dans le temps, un manque d'architecture musculaire native et
 154 une difficulté à produire des contractions spontanées (Eberli et al., 2009; Guo et al., 2014).
 155 Par ailleurs, elles ne reflètent pas complètement l'organisation structurale et le métabolisme
 156 du muscle adulte qui sont pourtant essentielles à la contraction et à la fonctionnalité du muscle

157 (Lieber & Fridén, 2000). Cela limite donc l'utilisation des systèmes de culture 2D dans les
 158 études biologiques ainsi que dans le remplacement de tissus pathologiques ou endommagés in
 159 vivo (Ghaemmaghami et al., 2012). Enfin, la culture cellulaire avec les systèmes in vitro
 160 conventionnels actuels présente des limites importantes liées à leur faible rapport
 161 surface/volume, l'absence de contrôle du pH, de la concentration en gaz ou en métabolites et
 162 n'est donc pas en cela évolutive (Oh et al., 1999). Pour finir, le développement de systèmes
 163 3D in vitro est motivé par la nécessité d'atténuer les considérations éthiques exigeant une
 164 réduction de l'utilisation d'animaux et d'améliorer les résultats chez les patients humains par
 165 l'identification de nouvelles thérapies grâce au criblage de médicaments et aux tests cellulaires
 166 (Bhatia & Ingber, 2014).

167

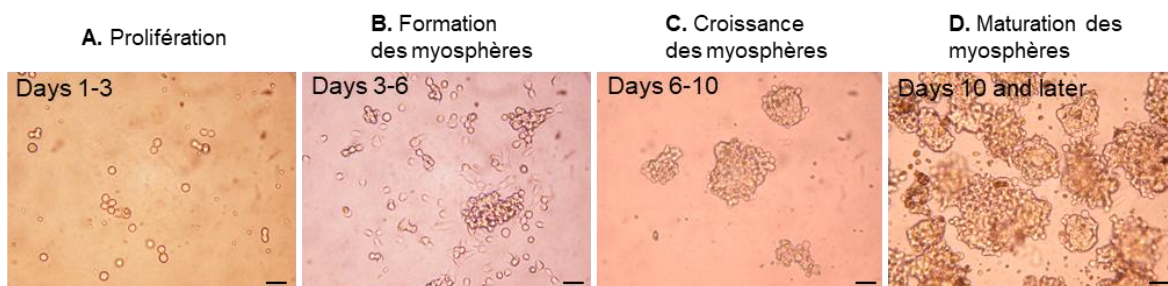
168 2. Développement d'un modèle 3D de culture cellulaire primaire 169 dérivée du muscle : les myosphères

170

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

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

188



189

190

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

192 *A. Lorsqu'elles sont cultivées en suspension, les cellules progénitrices/souches correspondent*
 193 *initialement à quelques cellules arrondies, petites et réfringentes. Dans les 1ers jours (jour 1-3)*
 194 *certaines d'entre elles peuvent apparaître en amas de deux à quatre cellules (B). Entre 3 à 6 jours,*
 195 *elles commencent à croître selon des modalités atypiques avec la formation de colonies de*
 196 *microsphéroïdes composées de quelques dizaines de cellules jointes qui pouvaient parfois*
 197 *apparaître superposées. Dans les jours suivants (jour 6-10), ces myosphères flottantes continuent*
 198 *de croître en taille et en nombre, atteignant plusieurs centaines de cellules (C). Après 10 jours, les*
 199 *myosphères apparaissent telles des complexes sphéroïdes très denses en cellules et volumineux et*
 200 *perdent leur capacité de prolifération (D). Barre d'échelle = 25 μ m. Iconographies liées aux travaux*
 201 *menés sur la caractérisation in vitro des cellules canines MuStem. D'après Dessauge et al. (2021).*
 202

203 Dans les premiers jours après l'isolement des cellules du tissu musculaire, obtenue après une
 204 dissociation mécanique et enzymatique, de petites cellules rondes, principalement
 205 individualisées, sont observées flottant parmi les débris. Au cours des jours suivants, les
 206 cellules individualisées évoluent en petits amas de quelques cellules, puis en amas plus grands
 207 d'une dizaine de cellules et forment plus tard des structures sphériques arrondies. Ces
 208 myosphères ont initialement une taille de 25 à 50 μ m et continuent à croître au fil du temps
 209 pour atteindre des tailles de 200 à 400 μ m. Les myosphères se propagent ensuite in vitro sous
 210 forme d'amas flottants de cellules arrondies présentant des diamètres différents. Elles peuvent
 211 être repiquées tous les 20-30 jours en piégeant des sphères > 100 μ m, en les dissociant avec
 212 de la dispase/collagénase puis en ensemençant les cellules à une densité de $1-10 \times 10^5$
 213 cellules/mL. Les cellules issues des myosphères nouvellement remises en culture formeront à
 214 leur tour de nouvelles sphères flottantes après plusieurs jours de culture. La caractérisation
 215 des myosphères chez la souris a révélé qu'elles contiennent des cellules myogéniques
 216 exprimant la protéine de surface (intégrine $\alpha 7$) et des facteurs de transcription (Pax7, Myf5 et
 217 MyoD) mais aussi des cellules non myogéniques n'exprimant pas l'intégrine $\alpha 7$, mais
 218 positives pour PDGFR α et Sca-1. Il a été suggéré que ce deuxième type cellulaire
 219 correspondait à une population de cellules interstitielles (Penrose & Westerman, 2012). Fait
 220 intéressant, il a été déterminé que les cellules dérivées des myosphères se comportent de
 221 manière similaire aux myoblastes primaires en ce sens qu'elles expriment principalement
 222 Pax7, Myf5 et MyoD et sont capables de former des myotubes multinucléés lorsqu'elles sont
 223 cultivées en condition adhérente (Westerman, 2015). Cependant, certaines différences en
 224 termes de taux de prolifération, de capacité de différenciation et de phénotype ont été
 225 rapportées entre les myosphères générées par plusieurs groupes, selon la procédure
 226 d'isolement et les milieux de culture utilisés. L'ajout de facteur inhibiteur de la leucémie (LIF)
 227 au milieu de croissance des myosphères améliore la prolifération et augmente
 228 considérablement la proportion de cellules exprimant Sca-1.

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

240 Grâce à leur structure 3D, les myosphères permettent d'obtenir des interactions cellule-cellule
 241 et une organisation spatiale entre différents types cellulaires plus proches de celles observées
 242 dans les tissus par rapport aux systèmes de culture 2D classiques. Contrairement aux cultures
 243 primaires dérivées de cellules dérivées du muscle cultivées en 2D dans lesquelles les
 244 progéniteurs sont rapidement perdus en raison de leur faible temps de division par rapport aux
 245 autres types de cellules résidentes, la culture de myosphères permet de maintenir les
 246 proportions cellulaires au cours des divisions. Un autre avantage est que la procédure de
 247 culture initiale est simple et relativement douce avec peu de manipulation des cellules
 248 dérivées du muscle fraîchement extraites. Cela contraste avec de nombreuses procédures
 249 d'isolement de CS qui intègrent l'utilisation de la cytométrie en flux, connue pour activer les
 250 CS et ainsi altérer leur profil d'expression génique (van den Brink et al., 2017). À titre
 251 d'exemple, l'expression de Notch1, qui joue un rôle central dans la détermination du
 252 comportement des CS, est modifiée dans les CS (Liu et al., 2007). Concernant la contribution
 253 des myosphères à la régénération musculaire, il a été montré chez l'homme que les cellules
 254 dérivées des myosphères participent à la formation de nouvelles fibres musculaires et à la
 255 génération de CS lorsqu'elles sont injectées dans les muscles endommagés. Aussi, les auteurs
 256 mentionnent qu'elles présentent une capacité de greffage supérieure à celle des myoblastes.
 257 Conformément à ces résultats, Westerman et al. ont démontré que l'injection de cellules
 258 fluorescentes, dérivées de myosphères dans le muscle de souris dystrophiques génait la
 259 formation de fibres musculaires exprimant la GFP deux semaines plus tard. Ces résultats ont
 260 souligné que les cellules dérivées des myosphères ont la capacité de régénérer le muscle
 261 blessé in vivo tout en conservant les propriétés des cellules souches. Cela démontre ainsi que
 262 les cellules dérivées des myosphères peuvent être très utiles en médecine régénérative pour le
 263 traitement des maladies musculaires.
 264

265 3. Développement de modèles 3D de muscles squelettiques : les 266 myobundles

267 Depuis les travaux pionniers conduisant à la formation de myotubes dans un gel de collagène
 268 (Vandenburgh, 1988) et à la construction de couches en 3D (Dennis & Kosnik, 2000), le
 269 domaine de l'ingénierie musculaire s'est considérablement développé. L'approche d'ingénierie
 270 est maintenant basée sur l'exploitation de deux composants principaux correspondant à un
 271 biomatériau qui assure une structure tissulaire appropriée et différents types de cellules
 272 résidentes dans les tissus. Concernant les matériaux de structure, ils doivent être inertes,
 273 résorbables par des processus de biodégradation, modifiables et présenter une cytotoxicité
 274 minimale (Rizzi et al., 2012; Fuoco et al., 2012). En outre, les biomatériaux optimaux doivent
 275 contenir une surface élevée pour l'adhésion cellulaire, soutenir l'intégrité mécanique du tissu,
 276 minimiser les distances de diffusion et se dégrader une fois qu'il n'y a plus besoin de support
 277 structurel (Rosso et al., 2004). Les structures sont obtenues à partir de sources naturelles
 278 (c'est-à-dire de la MEC) ou créées par des moyens artificiels à l'aide de matériaux
 279 synthétiques tels que la poly-L-lactique, le polylactique-glycolique et le poly-uréthane. Le
 280 principal avantage des structures synthétiques par rapport aux matériaux d'origine naturelle
 281 réside dans le fait qu'elles peuvent être caractérisées et fabriquées avec précision et avec un
 282 grand contrôle sur leurs propriétés physiques et chimiques. Des dispositifs hybrides ont
 283 également été testés comme matériaux spécifiques pour la génération de tissu musculaire
 284 (Hong et al., 2012; Wolf et al., 2015).
 285 Les trois principaux types de matériaux utilisés pour la production de faisceaux de myofibres
 286 sont successivement présentés ci-dessous avant la présentation des protocoles de bio-

287 ingénierie développés pour augmenter la maturation et la fonctionnalité du muscle
 288 squelettique modifié.
 289

290 **3.1. Matériau à base de protéines natives de la MEC**

291 Les interactions entre les cellules et la MEC (principalement collagène I-IV, fibrinogène,
 292 laminine et glyco-aminoglycanes ainsi qu'un assortiment de facteurs de croissance)
 293 contribuent aux processus cellulaires critiques au cours de la croissance et de la régénération
 294 musculaires. De plus, il a été démontré que les hydrogels d'origine naturelle (collagène,
 295 fibrine, Matrigel) supportent bien la haute densité et la propagation 3D des cellules
 296 musculaires murines C2C12 (Okano & Matsuda, 1997), l'alignement cellulaire
 297 unidirectionnel par l'application de contraintes géométriques (Bian & Bursac, 2009) et les
 298 contractions macroscopiques des tissus (Yamamoto et al., 2011). Les protéines natives de la
 299 MEC dérivées du muscle squelettique ont été largement utilisées dans le passé en tant que
 300 composant de matériau de structure 3D. A titre d'exemple, le laboratoire de Bursac a testé
 301 différents types de protéines matricielles (collagène I/fibrinogène/Matrigel) avec différentes
 302 concentrations d'hydrogel contenant des faisceaux de muscles squelettiques néonataux de Rat
 303 pour évaluer leur impact respectif sur la structure tissulaire, leur capacité à se contracter et à
 304 capter le calcium intracellulaire (Hinds et al., 2011). Le tissu musculaire modifié a été préparé
 305 sur la base d'une technique de moulage dans de l'hydrogel initialement développée par Rhim
 306 et al. (Rhim et al., 2007). Des moules pour la fabrication de tissu ont été générés en éliminant
 307 longitudinalement une section de 25 mm de long d'un tube en silicone de 4,7 mm de diamètre
 308 et en scellant les deux extrémités avec un petit morceau de polydiméthylsiloxane (PDMS).
 309 Les moules ont été stérilisés à l'éthanol, immergés dans une solution de pluronic F-127 à 0,2
 310 % (p/v) pour empêcher l'adhérence du gel, séchés à l'azote et placés dans une boîte de culture
 311 standard à 6 puits. Les languettes Velcro, qui servaient de sites de fixation du gel et
 312 permettaient la génération d'une tension longitudinale passive dans les faisceaux, ont été
 313 stérilisées à l'éthanol et fixées aux deux extrémités du moule avec des broches en acier
 314 inoxydable. Après le début de la polymérisation du gel de fibrine, par ajout de thrombine, un
 315 mélange de cellules/solution de gel a été injecté dans le moule en silicone et incubé à 37 °C
 316 jusqu'à la gélification. Les faisceaux de cellules/gel polymérisés ont ensuite été maintenus
 317 dans un milieu de croissance pendant 5 jours, puis basculés dans un milieu de différenciation
 318 sérique faible. Après deux semaines de culture, les faisceaux musculaires étaient constitués de
 319 fibres musculaires hautement alignées et striées et capables de se contracter. L'utilisation de la
 320 fibrine a donné une amplitude isométrique plus élevée que celles mesurées dans les faisceaux
 321 à base de collagène I. L'ajout de Matrigel aux hydrogels de collagène a amélioré la structure
 322 musculaire modifiée, tandis qu'une teneur élevée en collagène a eu des effets délétères sur la
 323 maturation musculaire. Des concentrations plus élevées de fibrine et de Matrigel ont produit
 324 de manière synergique une augmentation supplémentaire de la force de contraction.
 325 Contrairement au collagène qui a été initialement utilisé par la plupart des laboratoires, la
 326 fibrine a été présentée comme le meilleur choix en tant que matrice pour l'ingénierie tissulaire
 327 du muscle squelettique de rat en raison de sa capacité à être largement remodelée et dégradée
 328 (Grassl, Oegema & Tranquillo, 2002; Ross & Tranquillo, 2003) ainsi que sa raideur
 329 comparable à celle du muscle natif (Collet et al., 2005; Yang et al., 2007). Chez le bovin, elle
 330 favorise l'angiogenèse et l'extension des neurites, ce qui est essentiel pour la formation d'un
 331 muscle modifié entièrement fonctionnel pour des applications in vivo (Dietrich & Lelkes,
 332 2006).

333

334 **3.2. Hydrogel de fibrine**

335

336 En 2015, le laboratoire de Bursac a généré le premier système de culture biomimétique du
 337 muscle squelettique humain (« myobundle ») en utilisant des cellules coulées dans une
 338 matrice de fibrine/Matrigel et ancrées sur des cadres en nylon (Maffioletti et al., 2018). Les
 339 myobundles ont commencé à se contracter spontanément après 3 à 5 jours de culture et
 340 contenaient des myofibres densément emballées et alignées entourées à la périphérie des
 341 fibroblastes après 2 semaines de culture. La structure mature des myofibres était caractérisée
 342 par l'expression du CMH, des stries croisées et de multiples noyaux myogénine +. D'un point
 343 de vue fonctionnel, les récepteurs de l'acétylcholine (AChR) étaient également présents à la
 344 surface des myofibres. Une fraction des cellules a continué à exprimer le marqueur des CS,
 345 Pax7, suggérant une capacité de régénération telle que décrite précédemment dans un modèle
 346 de culture chez le Rat (Juhas, Ye & Bursac, 2016). De la même manière, le laboratoire de
 347 Gilbert a démontré une amélioration de la maturation des fibres et de l'expression de l'AChR
 348 suite à la différenciation myogénique en culture 3D (Afshar Bakooshi et al., 2019). Les
 349 auteurs ont produit des progéniteurs myogéniques primaires et des cellules CD56- (type
 350 fibroblastes) provenant de biopsies humaines et les ontensemencées à des concentrations
 351 différentes de fibrine/hydrogel Geltrex, Geltrex (2D) ou fibrinogène/mélange Geltrex. Des
 352 hydrogels chargés de cellules musculaires ont été formés dans un canal PDMS et ancrés à
 353 chaque extrémité du canal aux crochets en nylon du tissu Velcro, qui agissent comme des
 354 tendons artificiels et établissent une tension uni-axiale lors du remodelage et de la
 355 différenciation des tissus 3D. Alors que les cultures de fibres musculaires 2D étaient alignées
 356 régionalement mais globalement désorganisées, un alignement uniforme des fibres
 357 musculaires striées a été déterminé le long de l'axe de tension dans les tissus 3D.
 358 Contrairement aux fibres musculaires établies dans les cultures 2D, celles dérivées de la
 359 culture 3D ont progressivement augmentées de diamètre au cours des 3 semaines de culture
 360 tout en maintenant l'alignement des fibres et une structure contractile assemblée. De plus, une
 361 augmentation de l'expression des isoformes adultes rapides et lentes du CMH a été notée,
 362 suggérant une maturation structurelle progressive du sarcomère. Les tissus musculaires
 363 humains 3D étaient capables de générer une force active dès 10 jours de différenciation,
 364 comme en témoignent les contractions spontanées, qui n'ont pas été observées dans les
 365 cultures 2D. La stimulation de l'ACh a produit une réponse immédiate au tétanos dans les
 366 tissus 3D suggérant une abondance d'AChR actifs, tandis que la réponse des cultures de fibres
 367 musculaires 2D était significativement moindre et entraînait inévitablement des dommages
 368 aux fibres musculaires.

369 Maffioletti et al. ont différencié des cellules myogéniques humaines dérivées de cellules
 370 pluripotentes (de patients sains et dystrophiques) dans des hydrogels de fibrine (Moroni et al.,
 371 2018), en adaptant les travaux réalisés par une plate-forme d'ingénierie tissulaire cardiaque
 372 pour orienter les cellules le long d'un axe (Hansen et al., 2010). Après 10 jours de culture, les
 373 cellules ont généré une bande de tissu de 7 à 8 mm de long contenant des structures qui
 374 ressemblaient à des fibres musculaires squelettiques. De même, dans des conditions de culture
 375 3D optimisées, ils ont démontré que les progéniteurs myogéniques dérivés de plusieurs
 376 lignées de cellules souches pluripotentes humaines forment de manière reproductible des
 377 faisceaux de tissus musculaires squelettiques fonctionnels contenant des myotubes
 378 multinucléés alignés. Les faisceaux présentaient une maturation structurale et moléculaire
 379 accrue, une hypertrophie et une capacité de contraction pendant 4 semaines in vitro. Après
 380 implantation dans le muscle des membres postérieurs de souris immunodéprimées, ces
 381 faisceaux ont montré une capacité à survivre, à se vasculariser progressivement et à maintenir
 382 leur fonctionnalité (Rao et al., 2018). La formation in vitro de tels faisceaux représente une
 383 plate-forme microphysiologique intéressante pour la modélisation des maladies musculaires
 384 humaines et le développement de médicaments. En accord avec ces résultats, d'autres études
 385 ont confirmé que l'utilisation de l'environnement 3D est associée à des temps de culture plus

386 longs, une augmentation de la taille des myotubes, une augmentation de la teneur en protéines
 387 et une amélioration de la maturation de l'expression des gènes du CMH par rapport aux
 388 cultures 2D.

389 3.3. Hydrogel de gélatine méthacrylate

390
 391 Hosseini et al. ont déterminé qu'un hydrogel de gélatine méthacrylée à micromotifs (GelMa)
 392 était un substrat approprié pour aligner les myoblastes issus de la lignée cellulaire C2C12 et
 393 pour générer du tissu musculaire squelettique fonctionnel (Hosseini et al., 2012). La solution
 394 GelMA a été préparée à partir de la dissolution de la gélatine de type A dans l'anhydride
 395 méthacrylique. Pour générer des hydrogels GelMA micromoulés, elle a été versée dans une
 396 boîte de Pétri en polystyrène, puis un tampon en PDMS correspondant à un moule
 397 photorésistant d'un motif de rainures de 100 μm /arêtes de 50 μm a été appliqué. Le motif,
 398 réalisé sur une plaquette de silicium par une technique de photolithographie classique
 399 (Carosio et al., 2011; García-Prat, Sousa-Victor & Muñoz-Cánoves, 2013), mesurait 50 μm de
 400 hauteur et couvrait une surface de 1 cm^2 . Le motif GelMA a ensuite été photoréticulé sous UV
 401 et le tampon PDMS a été délicatement retiré. Les myoblastes C2C12 qui ont été cultivés sur
 402 les hydrogels GelMA à micromotifs étaient significativement plus alignés au jour 3 de la
 403 culture que les cellules témoins cultivées sur des hydrogels sans motif. Les hydrogels GelMA
 404 ont été présentés comme des matériaux à haute performance pour le développement de
 405 l'ingénierie tissulaire en permettant aux cellules cultivées de migrer, de proliférer et de se
 406 mettre en contact les unes avec les autres. De plus, leurs propriétés mécaniques sont ajustables
 407 et leur capacité de diffusion élevée à travers leurs pores est avantageuse pour la nutrition
 408 cellulaire et l'élimination des déchets.
 409

410 3.4. Méthodes pour augmenter la maturation et la fonction des muscles

411 squelettiques modifiés

412 a. Stimulations électriques et mécaniques

413
 414 Bien que les myobundles miment de nombreuses caractéristiques morphologiques et
 415 fonctionnelles du muscle squelettique natif, leur taille et leurs propriétés contractiles
 416 isométriques sont cependant inférieures à celles du muscle adulte natif, révélant une
 417 maturation musculaire incomplète (Madden et al., 2015; Roche et al., 2015). Sous stimulation
 418 électrique prolongée, la culture primaire de myoblastes (humains, lapins et souris) sur des
 419 micromodèles de fibrine ou d'acide polylactique présente une formation accrue de myotubes
 420 et un taux de différenciation plus élevé (Pedrotty et al., 2005; Flaibani et al., 2009). De plus,
 421 une augmentation de la maturation et de la force du myobundle a été établie chez les rongeurs
 422 (Huang, Dennis & Baar, 2006; Donnelly et al., 2010) et l'Homme (Khodabukus & Baar,
 423 2009) dans des tissus musculaires conçus en 3D. Pour cela, une stimulation électrique a été
 424 réalisée entre les semaines 1 et 2 de différenciation du myobundle en utilisant des périodes de
 425 stimulation d'une heure séparées par des repos de 7 heures. Plus précisément, les myobundles
 426 ont été stimulés électriquement en continu à 1 Hz ou avec un train d'impulsions de 0,5 sec, 10
 427 Hz toutes les 5 sec, délivrant ainsi la même quantité totale d'impulsions de stimulation.
 428 L'utilisation de protocoles de chargement cyclique ou d'étirement a révélé que la stimulation
 429 mécanique induit également une hypertrophie musculaire et une teneur en protéines (Powell
 430 et al., 2002) ainsi qu'une augmentation de la différenciation et de la fonction musculaires
 431 modifiées chez l'homme (Handschin et al., 2015).

432 **b. Systèmes de co-culture**

 433
 434 Pour améliorer la formation de tissus musculaires matures avec des fonctionnalités plus
 435 élevées, différents systèmes de co-culture ont été développés dans des protocoles de bio-
 436 ingénierie. Les myoblastes C2C12 cultivés dans des hydrogels GelMa microstructurés avec
 437 des cellules neurales PC12 ont montré une différenciation améliorée avec une formation, un
 438 alignement et une longueur de myotube améliorés (Ostrovidov et al., 2017). Au niveau
 439 moléculaire, une augmentation d'expression des marqueurs spécifiques de la différenciation
 440 musculaire, de la maturation et des jonctions neuromusculaires a également été observée. Une
 441 meilleure organisation vasculaire a été établie en tri-culture composée de myoblastes, de
 442 fibroblastes et de cellules endothéliales (Koffler et al., 2011). D'autres études, utilisant une co-
 443 culture de C2C12 et de cellules endothéliales, ont montré le développement de tissu
 444 prévascularisé avec formation d'un réseau capillaire, permettant une anastomose fonctionnelle
 445 rapide lors de la transplantation (Sasagawa et al., 2010). La jonction neuromusculaire est une
 446 synapse hautement organisée formée entre un axone motoneuronal et une fibre musculaire,
 447 qui est responsable de la transmission des signaux efférents des motoneurons projetés aux
 448 fibres musculaires afin d'activer la contraction des fibres. En 2019, le laboratoire de Gilbert a
 449 rapporté une méthode intégrant des repères architecturaux avec des techniques de co-culture
 450 pour créer un environnement propice à la formation de novo de jonctions neuromusculaires
 451 humaine adulte dès 2 semaines de culture. Les cultures de motoneurons ont été mélangées
 452 avec des progéniteurs myogéniques dans le mélange d'hydrogel etensemencées ensemble
 453 dans les canaux PDMS. Après 10 jours en milieu de différenciation, les co-cultures se sont
 454 auto-organisées de telle sorte que les progéniteurs myogéniques fusionnent pour former des
 455 fibres musculaires multinucléées, alignées et striées avec des ensembles de motoneurons
 456 positionnés à la périphérie des faisceaux musculaires. L'analyse par Western Blot a confirmé
 457 l'expression des protéines MuSK et rapsyn, deux protéines synaptiques décisives dans la
 458 synaptogenèse induite par l'agrine. Des regroupements d'AChR plus nombreux et plus grands
 459 ont été observés dans les co-cultures 3D par rapport aux cultures musculaires 3D seules, en
 460 particulier aux sites où les neurites musculaires sont entrées en contact avec les fibres
 461 musculaires. Dans l'ensemble, dans des études où les fibres musculaires ont été cultivées côte
 462 à côte en 2D, les auteurs ont montré que le système de culture 3D permettait le maintien à
 463 long terme de la maturation des fibres musculaires en culture.
 464

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

 467
 468 Au cours des dernières années, des techniques de bio-impression ont émergé pour produire
 469 des plate-formes 3D avec ou sans cellules. Leurs principaux avantages reposent sur leur
 470 reproductibilité, leur adéquation, leur précision mais aussi sur la capacité de bio-ingénierie de
 471 diverses constructions tissulaires fonctionnelles avec une géométrie complexe en construisant
 472 des hydrogels chargés de cellules (couche par couche) (Moroni et al., 2018). Plusieurs
 473 méthodes de microfabrication ont été développées pour générer des structures biomimétiques
 474 pouvant ressembler à des tissus musculaires à l'échelle du micron, tels que les méthodes
 475 d'électrofilage ou electrospinning, de micromoulage, de photolithographie et de lithographie
 476 douce. En bref, l'électrofilage est une méthode largement appliquée dans la synthèse de
 477 structures d'ingénierie tissulaire car elle peut à la fois contrôler la taille et la morphologie des
 478 nanofibres en ajustant les paramètres techniques et utiliser presque tous les polymères et
 479 additifs solubles (Soliman et al., 2018; Gilbert-Honick et al., 2018). À l'aide d'un système

480 d'électrofilage humide, une structure composite 3D contenant un cœur de fil de nanofibre
 481 aligné a été conçu (Wang et al., 2015). Dans ce contexte, les myoblastes C2C12 ont montré
 482 un bon alignement et se sont correctement développés en formant des myotubes allongés en
 483 3D. L'approche de micromoulage présente les avantages d'un temps de traitement court et de
 484 procédures faciles à utiliser avec la possibilité d'utiliser des élastomères pour la création de
 485 constructions tissulaires (Weinandy et al., 2014). Il a été démontré que les substrats PDMS
 486 ondulés/à motifs sinusoïdaux permettaient aux myoblastes C2C12 de former des myotubes
 487 bien alignés après 6 jours de culture. Les mêmes résultats ont été obtenus sur des microfibrilles
 488 d'alginate avec des sites adhésifs de protéines de la MEC à motifs (fibronectine) générés à
 489 l'aide de micromoulage et d'un système d'impression par microcontact (Patil, Szymanski &
 490 Feinberg, 2016). La photolithographie est un procédé permettant de transférer les
 491 caractéristiques géométriques d'un masque sur un substrat en utilisant une résine
 492 photosensible et une source lumineuse (Nakanishi et al., 2008). Lorsque les résines
 493 photosensibles sont exposées à une irradiation UV avec ou sans masque optique, les motifs
 494 sont transférés du masque optique aux matériaux, permettant la production d'échafaudages
 495 pour l'ingénierie tissulaire (Albisetti et al., 2016). La lithographie douce repose sur l'utilisation
 496 d'un tampon élastomère souple avec un micromotif dont plusieurs copies peuvent être
 497 préparées par procédé photolithographique, ce qui la rend plus pratique et moins chère que la
 498 photolithographie standard (Lindquist et al., 2012).

499 Les méthodes de bio-impression 3D ont été largement étudiées au cours de la dernière
 500 décennie afin de superposer des cellules musculaires vivantes et des biomatériaux couche par
 501 couche pour permettre la croissance cellulaire et les signaux cellulaires grâce à la modulation
 502 de l'interaction cellule-cellule et de l'interaction cellule-matrice (Kang et al., 2020). Ces
 503 méthodes constituent des technologies de fabrication puissantes pour l'ingénierie tissulaire car
 504 elles peuvent facilement recréer des tissus volumineux et complexes, pour doter les cellules
 505 d'un micro-environnement 3D biomimétique. Les méthodes conventionnelles peuvent être
 506 classées en trois groupes principaux de méthodes : jet d'encre, micro-extrusion et laser
 507 (Agarwala, 2016). Concernant la méthode jet d'encre, les approches les plus couramment
 508 utilisées pour imprimer de l'encre biologique sur un substrat sont les buses thermiques et
 509 piézoélectriques. La résolution des constructions imprimées peut cependant être limitée en
 510 raison du style d'injection de buse et des caractéristiques du matériau. Avec la méthode de
 511 micro-extrusion, les techniques généralement utilisées pour la dispersion des biomatériaux sur
 512 un substrat sont les distributeurs pneumatiques, à piston et à vis. La construction de grandes
 513 structures tissulaires de forme libre s'est révélée assez difficile en raison d'un problème de
 514 stabilité mécanique et de moyens d'impression inadéquats. La méthode assistée par laser a
 515 l'avantage d'être sans buse, ce qui peut éviter le colmatage observé avec les méthodes
 516 précédentes, mais est limitée par l'exigence d'une gélification d'hydrogel rapide pour obtenir
 517 des motifs imprimés à haute résolution, entraînant des débits faibles (Merceron et al., 2015).
 518 Récemment, une optimisation des encres biologiques a été opérée pour augmenter leurs
 519 propriétés physico-chimiques avant, pendant et après l'impression 3D, ce qui est apparu
 520 essentiel pour assurer le succès de la bio-impression 3D (Mredha et al., 2018). Par rapport à
 521 tous ces développements de structures tissulaires 3D à partir d'hydrogels, une structure
 522 alignée/micro-topographique in situ a récemment été produite en utilisant une MEC
 523 décellularisée (dECM) comme composant biochimique et un processus d'impression cellulaire
 524 3D modifié. La dECM a été dérivée de la décellularisation des muscles squelettiques porcins
 525 et modifiée chimiquement par un procédé au méthacrylate pour améliorer la stabilité
 526 mécanique. Après l'ensemencement dans cette structure sans hydrogel, les myoblastes C2C12
 527 se sont alignés et différenciés pour générer un pourcentage élevé de formation de myotubes.
 528 Un autre type d'encres biologiques à base d'ECM spécifique au tissu musculaire a été
 529 présenté pour induire efficacement la différenciation cellulaire et le développement tissulaire

530 (Choi et al., 2016). En effet, par rapport aux constructions conventionnelles imprimées de
 531 collagène, cette nouvelle encre biologique a contribué à améliorer significativement la
 532 prolifération cellulaire, une plus grande expression des gènes myogéniques ainsi qu'une
 533 formation de myotubes plus matures caractérisée par la présence d'un motif de bande striée et
 534 d'une contraction en réponse à la stimulation électrique.

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

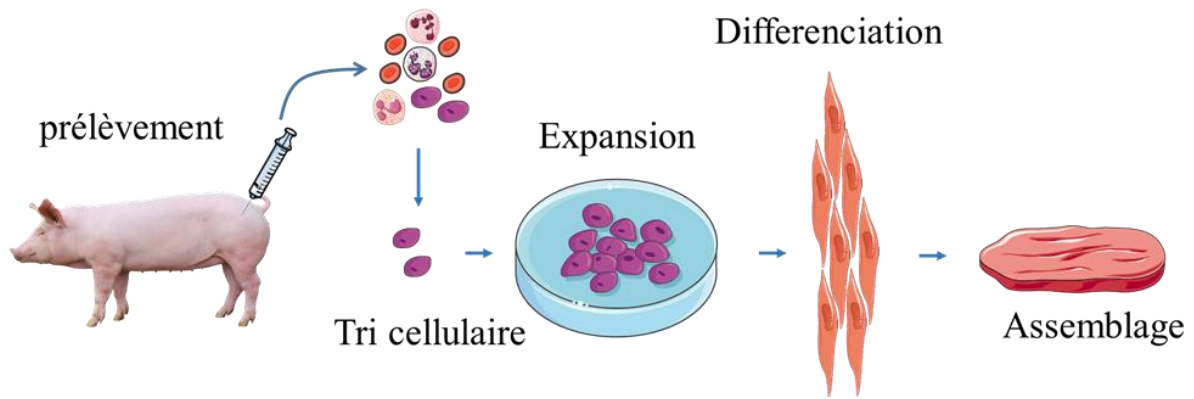
538

539 **5. Utilisation des modèles in vitro de tissus musculaires pour l'étude** 540 **des animaux d'élevage et perspectives d'application**

541

542 Le vieillissement affecte négativement la régénération musculaire et le potentiel des cellules
 543 souches musculaires, entraînant une paupérisation des tissus musculaires ou une sarcopénie
 544 (García-Prat, Sousa-Victor & Muñoz-Cánoves, 2013). Plusieurs études ont montré que les CS
 545 âgées présentaient des altérations fonctionnelles, parmi lesquelles la capacité à s'activer,
 546 proliférer et à se différencier (Conboy et al., 2003). Chez le Porc, une structure en hydrogel à
 547 base de poly-éthylène glycol (PEG) a été utilisée pour compléter les données sur l'impact du
 548 vieillissement sur l'efficacité de la régénération tissulaire (Fuoco et al., 2014). Ainsi, des
 549 péricytes adultes dérivés de muscles squelettiques, connus pour contribuer au processus de
 550 régénération, ont été isolés à partir de jeunes porcelets et de porcs adultes (sangliers). La
 551 suspension cellulaire a été mélangée avec une solution de fibrinogène poly-éthylène glycosylé
 552 (F-PEG), ajoutée dans des moules cylindriques en silicone et placée sous une lampe UV à
 553 ondes longues pour permettre la transition du F-PEG en gel. La F-PEG a été décrite comme
 554 ayant une influence majeure sur la différenciation des progéniteurs myogéniques en
 555 fournissant un micro-environnement 3D adapté au développement des fibres musculaires. Le
 556 milieu de culture a ensuite été ajouté immédiatement aux hydrogels polymérisés pour assurer
 557 la croissance cellulaire. Les « bouchons » ont été cultivés pendant 24 h dans du milieu de
 558 croissance supplémenté en sérum puis transférés dans un milieu de différenciation appauvri
 559 en sérum pendant 5 jours afin de favoriser la formation de fibres musculaires. In vitro, les
 560 péricytes des porcs adultes avaient une morphologie et une capacité de formation de colonies
 561 similaires à celles des porcelets, mais une capacité altérée à former des myotubes et des
 562 structures de type capillaire. Fait intéressant, il a également été démontré que l'utilisation
 563 d'une structure d'hydrogel à base de PEG pour soutenir les péricytes adultes améliorait
 564 considérablement leur différenciation myogénique et leur potentiel angiogénique in vitro et in
 565 vivo, en créant une niche appropriée pour favoriser la régénération des muscles squelettiques
 566 et la croissance des vaisseaux sanguins.

567 Plusieurs méthodes de production de viande « cultivée » ont été proposées et différents types
 568 de cellules ont été considérées, notamment les cellules souches embryonnaires, les cellules
 569 souches pluripotentes induites, les cellules souches mésenchymateuses et les CS (Post, 2012).
 570 Pour la viande « cultivée » en 3D, les cellules sont cultivées dans des structures qui
 571 permettent la hiérarchisation cellulaire et leur développement. La structure 3D idéale devant
 572 être comestible, il n'est donc pas nécessaire de la retirer après culture. De plus, le muscle
 573 produit doit conserver une souplesse pour ne pas se détacher des myotubes en développement
 574 et favoriser la vascularisation (Figure 3).

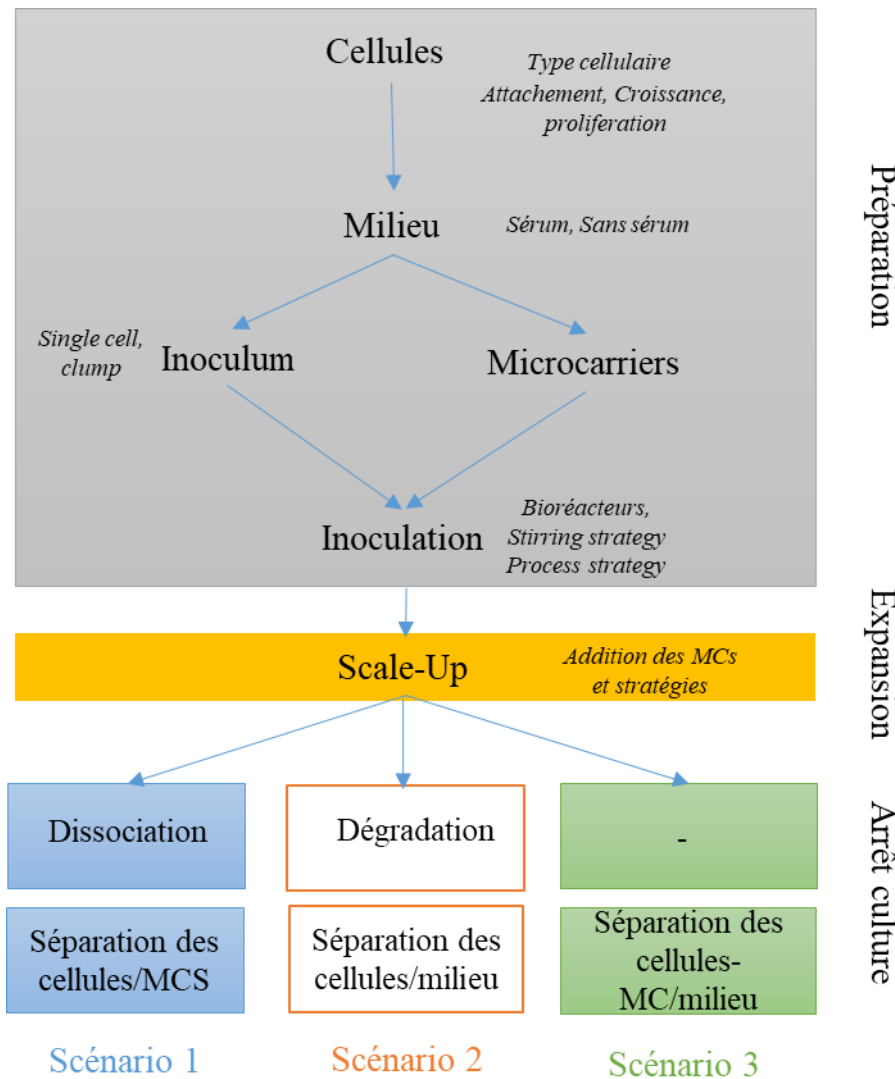


575
576

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

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

584
585



586

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

588

589 *Les MC servent de substrat temporaire pour la fixation et la prolifération des cellules et doivent*
 590 *donc être séparés des cellules à un certain stade du bioprocédé. Les microcarriers servent de*
 591 *substrat temporaire pour la prolifération cellulaire mais sont dégradés ou dissous au cours du*
 592 *bioprocédé. Ils sont incorporés dans le produit final et doivent donc être comestibles (d'après Post*
 593 *(2012) et Dessauge et al. (2021)).*

594

595

596 Les cellules souches musculaires bovines semblent les candidats les simples et les plus
 597 appropriés à la culture de viande in vitro (Figure 4). Les avantages potentiels des
 598 microcarriers (MC) à utiliser pour la production de viande peuvent être considérés selon trois
 599 scénarios différents. Dans le scénario 1, les MC sont utilisés comme substrats temporaires
 600 pour l'expansion des CS et doivent être retirés à la fin du processus. Il existe deux conditions
 601 préalables importantes dans ce cas, à savoir la nécessité pour les MC de fournir un rendement
 602 de détachement élevé et une séparation facile des cellules. Concernant le scénario 2, les MC
 603 servent également de substrat temporaire pour l'expansion des CS mais au lieu d'être séparés à
 604 la fin du processus, comme cela a été fait dans le scénario 1, ils peuvent être dégradés lors
 605 d'une étape préalable. Dans ce cas, l'étape de dissociation peut être remplacée par une étape
 606 de dégradation du MC pour obtenir une suspension cellulaire unique. Enfin, dans le scénario

607 3, les MC sont composés de matériaux comestibles et peuvent donc être intégrés dans le
 608 produit final. Contrairement au scénario précédent où les MC sont considérés comme des
 609 matériaux en contact avec les aliments, ils doivent être ici conformes aux réglementations
 610 pour une utilisation en tant qu'ingrédient ou additif alimentaire. En effet, en plus de favoriser
 611 la croissance cellulaire, un MC comestible pourrait également faire partie du produit final et
 612 affecter les attributs sensoriels du produit carné, tels que le goût, la couleur ou la texture. Afin
 613 de ressembler davantage au produit naturel, la société israélienne nommée MeaTech a
 614 proposé d'utiliser une technique d'impression 3D dans le but d'améliorer la texture de la
 615 viande « cultivée ».

617 Conclusion

618 La réussite des cultures 3D est considérablement dépendante de l'espèce étudiée et de la
 619 technique choisie. Dans l'ensemble, l'utilisation in vitro modèles 3D pour le tissu musculaire
 620 squelettique peut être considérée comme très intéressante dans quatre domaines d'application :
 621 i) la caractérisation approfondie des progéniteurs myogéniques dans un large éventail
 622 d'espèces, notamment le Porc, la volaille et le Poisson pour étudier la notion de diversité
 623 cellulaire résidente dans les tissus ; ii) une meilleure compréhension des dérégulations
 624 affectant les progéniteurs myogéniques chez les espèces de production ; et iii) la mise à
 625 disposition d'un modèle d'étude pour le processus de maturation de la viande.

626
627
628
629

630 Références

- 631
 632 Afshar Bakooshli M, Lippmann ES, Mulcahy B, Iyer N, Nguyen CT, Tung K, Stewart BA,
 633 van den Dorpel H, Fuehrmann T, Shoichet M, Bigot A, Pegoraro E, Ahn H, Ginsberg
 634 H, Zhen M, Ashton RS, Gilbert PM. 2019. A 3D culture model of innervated human
 635 skeletal muscle enables studies of the adult neuromuscular junction. *eLife* 8:e44530.
 636 DOI: 10.7554/eLife.44530.
- 637 Agarwala S. 2016. A Perspective on 3D Bioprinting Technology: Present and Future.
 638 *American Journal of Engineering and Applied Sciences* 9:985–990. DOI:
 639 10.3844/ajeassp.2016.985.990.
- 640 Albisetti E, Carroll KM, Lu X, Curtis JE, Petti D, Bertacco R, Riedo E. 2016.
 641 Thermochemical scanning probe lithography of protein gradients at the nanoscale.
 642 *Nanotechnology* 27:315302. DOI: 10.1088/0957-4484/27/31/315302.

- 643 Arsic N, Mamaeva D, Lamb NJ, Fernandez A. 2008. Muscle-derived stem cells isolated as
 644 non-adherent population give rise to cardiac, skeletal muscle and neural lineages.
 645 *Experimental Cell Research* 314:1266–1280. DOI: 10.1016/j.yexcr.2008.01.009.
- 646 Bhatia SN, Ingber DE. 2014. Microfluidic organs-on-chips. *Nature Biotechnology* 32:760–
 647 772. DOI: 10.1038/nbt.2989.
- 648 Bian W, Bursac N. 2009. Engineered skeletal muscle tissue networks with controllable
 649 architecture. *Biomaterials* 30:1401–1412. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2008.11.015.
- 650 van den Brink SC, Sage F, Vértesy Á, Spanjaard B, Peterson-Maduro J, Baron CS, Robin C,
 651 van Oudenaarden A. 2017. Single-cell sequencing reveals dissociation-induced gene
 652 expression in tissue subpopulations. *Nature Methods* 14:935–936. DOI:
 653 10.1038/nmeth.4437.
- 654 Carosio S, Berardinelli MG, Aucello M, Musarò A. 2011. Impact of ageing on muscle cell
 655 regeneration. *Ageing Research Reviews* 10:35–42. DOI: 10.1016/j.arr.2009.08.001.
- 656 Choi Y-J, Kim TG, Jeong J, Yi H-G, Park JW, Hwang W, Cho D-W. 2016. 3D Cell Printing
 657 of Functional Skeletal Muscle Constructs Using Skeletal Muscle-Derived Bioink.
 658 *Advanced Healthcare Materials* 5:2636–2645. DOI: 10.1002/adhm.201600483.
- 659 Collet J-P, Shuman H, Ledger RE, Lee S, Weisel JW. 2005. The elasticity of an individual
 660 fibrin fiber in a clot. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United*
 661 *States of America* 102:9133–9137. DOI: 10.1073/pnas.0504120102.
- 662 Conboy IM, Conboy MJ, Smythe GM, Rando TA. 2003. Notch-mediated restoration of
 663 regenerative potential to aged muscle. *Science (New York, N.Y.)* 302:1575–1577. DOI:
 664 10.1126/science.1087573.
- 665 Dennis RG, Kosnik PE. 2000. Excitability and isometric contractile properties of mammalian
 666 skeletal muscle constructs engineered in vitro. *In Vitro Cellular & Developmental*

- 667 *Biology. Animal* 36:327–335. DOI: 10.1290/1071-
- 668 2690(2000)036<0327:EAICPO>2.0.CO;2.
- 669 Dessauge F, Schleder C, Perruchot M-H, Rouger K. 2021. 3D in vitro models of skeletal
- 670 muscle: myosphere, myobundle and bioprinted muscle construct. *Veterinary Research*
- 671 52:72. DOI: 10.1186/s13567-021-00942-w.
- 672 Dietrich F, Lelkes PI. 2006. Fine-tuning of a three-dimensional microcarrier-based
- 673 angiogenesis assay for the analysis of endothelial-mesenchymal cell co-cultures in
- 674 fibrin and collagen gels. *Angiogenesis* 9:111–125. DOI: 10.1007/s10456-006-9037-x.
- 675 Donnelly K, Khodabukus A, Philp A, Deldicque L, Dennis RG, Baar K. 2010. A novel
- 676 bioreactor for stimulating skeletal muscle in vitro. *Tissue Engineering. Part C,*
- 677 *Methods* 16:711–718. DOI: 10.1089/ten.TEC.2009.0125.
- 678 Eberli D, Soker S, Atala A, Yoo JJ. 2009. Optimization of human skeletal muscle precursor
- 679 cell culture and myofiber formation in vitro. *Methods* 47:98–103. DOI:
- 680 10.1016/j.ymeth.2008.10.016.
- 681 Flaibani M, Boldrin L, Cimetta E, Piccoli M, De Coppi P, Elvassore N. 2009. Muscle
- 682 differentiation and myotubes alignment is influenced by micropatterned surfaces and
- 683 exogenous electrical stimulation. *Tissue Engineering. Part A* 15:2447–2457. DOI:
- 684 10.1089/ten.tea.2008.0301.
- 685 Fuoco C, Salvatori ML, Biondo A, Shapira-Schweitzer K, Santoleri S, Antonini S, Bernardini
- 686 S, Tedesco FS, Cannata S, Seliktar D, Cossu G, Gargioli C. 2012. Injectable
- 687 polyethylene glycol-fibrinogen hydrogel adjuvant improves survival and
- 688 differentiation of transplanted mesoangioblasts in acute and chronic skeletal-muscle
- 689 degeneration. *Skeletal Muscle* 2:24. DOI: 10.1186/2044-5040-2-24.
- 690 Fuoco C, Sangalli E, Vono R, Testa S, Sacchetti B, Latronico MVG, Bernardini S, Madeddu
- 691 P, Cesareni G, Seliktar D, Rizzi R, Bearzi C, Cannata SM, Spinetti G, Gargioli C.

- 692 2014. 3D hydrogel environment rejuvenates aged pericytes for skeletal muscle tissue
693 engineering. *Frontiers in Physiology* 5:203. DOI: 10.3389/fphys.2014.00203.
- 694 García-Prat L, Sousa-Victor P, Muñoz-Cánoves P. 2013. Functional dysregulation of stem
695 cells during aging: a focus on skeletal muscle stem cells. *The FEBS journal* 280:4051–
696 4062. DOI: 10.1111/febs.12221.
- 697 Ghaemmaghami AM, Hancock MJ, Harrington H, Kaji H, Khademhosseini A. 2012.
698 Biomimetic tissues on a chip for drug discovery. *Drug Discovery Today* 17:173–181.
699 DOI: 10.1016/j.drudis.2011.10.029.
- 700 Gilbert-Honick J, Ginn B, Zhang Y, Salehi S, Wagner KR, Mao H-Q, Grayson WL. 2018.
701 Adipose-derived Stem/Stromal Cells on Electrospun Fibrin Microfiber Bundles
702 Enable Moderate Muscle Reconstruction in a Volumetric Muscle Loss Model. *Cell*
703 *Transplantation* 27:1644–1656. DOI: 10.1177/0963689718805370.
- 704 Grassl ED, Oegema TR, Tranquillo RT. 2002. Fibrin as an alternative biopolymer to type-I
705 collagen for the fabrication of a media equivalent. *Journal of Biomedical Materials*
706 *Research* 60:607–612. DOI: 10.1002/jbm.10107.
- 707 Guo X, Greene K, Akanda N, Smith A, Stancescu M, Lambert S, Vandeburgh H, Hickman J.
708 2014. In vitro Differentiation of Functional Human Skeletal Myotubes in a Defined
709 System. *Biomaterials Science* 2:131–138. DOI: 10.1039/C3BM60166H.
- 710 Handschin C, Mortezaei A, Plock J, Eberli D. 2015. External physical and biochemical
711 stimulation to enhance skeletal muscle bioengineering. *Advanced Drug Delivery*
712 *Reviews* 82–83:168–175. DOI: 10.1016/j.addr.2014.10.021.
- 713 Hansen A, Eder A, Bönstrup M, Flato M, Mewe M, Schaaf S, Aksehirlioglu B, Schwoerer
714 AP, Schwörer A, Uebeler J, Eschenhagen T. 2010. Development of a drug screening
715 platform based on engineered heart tissue. *Circulation Research* 107:35–44. DOI:
716 10.1161/CIRCRESAHA.109.211458.

- 717 Hinds S, Bian W, Dennis RG, Bursac N. 2011. The role of extracellular matrix composition in
 718 structure and function of bioengineered skeletal muscle. *Biomaterials* 32:3575–3583.
 719 DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.01.062.
- 720 Hong Y, Takanari K, Amoroso NJ, Hashizume R, Brennan-Pierce EP, Freund JM, Badylak
 721 SF, Wagner WR. 2012. An elastomeric patch electrospun from a blended solution of
 722 dermal extracellular matrix and biodegradable polyurethane for rat abdominal wall
 723 repair. *Tissue Engineering. Part C, Methods* 18:122–132. DOI:
 724 10.1089/ten.TEC.2011.0295.
- 725 Hosseini V, Ahadian S, Ostrovidov S, Camci-Unal G, Chen S, Kaji H, Ramalingam M,
 726 Khademhosseini A. 2012. Engineered contractile skeletal muscle tissue on a
 727 microgrooved methacrylated gelatin substrate. *Tissue Engineering. Part A* 18:2453–
 728 2465. DOI: 10.1089/ten.TEA.2012.0181.
- 729 Huang Y-C, Dennis RG, Baar K. 2006. Cultured slow vs. fast skeletal muscle cells differ in
 730 physiology and responsiveness to stimulation. *American Journal of Physiology. Cell*
 731 *Physiology* 291:C11-17. DOI: 10.1152/ajpcell.00366.2005.
- 732 Ikemoto M, Fukada S-I, Uezumi A, Masuda S, Miyoshi H, Yamamoto H, Wada MR,
 733 Masubuchi N, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S. 2007. Autologous transplantation of
 734 SM/C-2.6(+) satellite cells transduced with micro-dystrophin CS1 cDNA by lentiviral
 735 vector into mdx mice. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of*
 736 *Gene Therapy* 15:2178–2185. DOI: 10.1038/sj.mt.6300295.
- 737 Janssen I, Heymsfield SB, Wang ZM, Ross R. 2000. Skeletal muscle mass and distribution in
 738 468 men and women aged 18-88 yr. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.:*
 739 *1985)* 89:81–88. DOI: 10.1152/jappl.2000.89.1.81.
- 740 Juhas M, Ye J, Bursac N. 2016. Design, evaluation, and application of engineered skeletal
 741 muscle. *Methods (San Diego, Calif.)* 99:81–90. DOI: 10.1016/j.ymeth.2015.10.002.

- 742 Kang MS, Lee SH, Park WJ, Lee JE, Kim B, Han D-W. 2020. Advanced Techniques for
 743 Skeletal Muscle Tissue Engineering and Regeneration. *Bioengineering (Basel,*
 744 *Switzerland)* 7:E99. DOI: 10.3390/bioengineering7030099.
- 745 Khodabukus A, Baar K. 2009. Regulating Fibrinolysis to Engineer Skeletal Muscle from the
 746 C2C12 Cell Line. *Tissue Engineering Part C: Methods* 15:501–511. DOI:
 747 10.1089/ten.tec.2008.0286.
- 748 Koffler J, Kaufman-Francis K, Shandalov Y, Yulia S, Egozi D, Dana E, Pavlov DA, Daria
 749 AP, Landesberg A, Levenberg S. 2011. Improved vascular organization enhances
 750 functional integration of engineered skeletal muscle grafts. *Proceedings of the*
 751 *National Academy of Sciences of the United States of America* 108:14789–14794.
 752 DOI: 10.1073/pnas.1017825108.
- 753 Lieber RL, Fridén J. 2000. Functional and clinical significance of skeletal muscle
 754 architecture. *Muscle & Nerve* 23:1647–1666. DOI: 10.1002/1097-
 755 4598(200011)23:11<1647::aid-mus1>3.0.co;2-m.
- 756 Lindquist NC, Nagpal P, McPeak KM, Norris DJ, Oh S-H. 2012. Engineering metallic
 757 nanostructures for plasmonics and nanophotonics. *Reports on Progress in Physics.*
 758 *Physical Society (Great Britain)* 75:036501. DOI: 10.1088/0034-4885/75/3/036501.
- 759 Liu JY, Swartz DD, Peng HF, Gugino SF, Russell JA, Andreadis ST. 2007. Functional tissue-
 760 engineered blood vessels from bone marrow progenitor cells. *Cardiovascular*
 761 *Research* 75:618–628. DOI: 10.1016/j.cardiores.2007.04.018.
- 762 Madden L, Juhas M, Kraus WE, Truskey GA, Bursac N. 2015. Bioengineered human
 763 myobundles mimic clinical responses of skeletal muscle to drugs. *eLife* 4:e04885.
 764 DOI: 10.7554/eLife.04885.
- 765 Maffioletti SM, Sarcar S, Henderson ABH, Mannhardt I, Pinton L, Moyle LA, Steele-Stallard
 766 H, Cappellari O, Wells KE, Ferrari G, Mitchell JS, Tyzack GE, Kotiadis VN, Khedr

- 767 M, Ragazzi M, Wang W, Duchen MR, Patani R, Zammit PS, Wells DJ, Eschenhagen
 768 T, Tedesco FS. 2018. Three-Dimensional Human iPSC-Derived Artificial Skeletal
 769 Muscles Model Muscular Dystrophies and Enable Multilineage Tissue Engineering.
 770 *Cell Reports* 23:899–908. DOI: 10.1016/j.celrep.2018.03.091.
- 771 Merceron TK, Burt M, Seol Y-J, Kang H-W, Lee SJ, Yoo JJ, Atala A. 2015. A 3D bioprinted
 772 complex structure for engineering the muscle-tendon unit. *Biofabrication* 7:035003.
 773 DOI: 10.1088/1758-5090/7/3/035003.
- 774 Moroni L, Burdick JA, Highley C, Lee SJ, Morimoto Y, Takeuchi S, Yoo JJ. 2018.
 775 Biofabrication strategies for 3D in vitro models and regenerative medicine. *Nature*
 776 *Reviews. Materials* 3:21–37. DOI: 10.1038/s41578-018-0006-y.
- 777 Mredha MdTI, Guo YZ, Nonoyama T, Nakajima T, Kurokawa T, Gong JP. 2018. A Facile
 778 Method to Fabricate Anisotropic Hydrogels with Perfectly Aligned Hierarchical
 779 Fibrous Structures. *Advanced Materials* 30:1704937. DOI: 10.1002/adma.201704937.
- 780 Nakanishi J, Takarada T, Yamaguchi K, Maeda M. 2008. Recent advances in cell
 781 micropatterning techniques for bioanalytical and biomedical sciences. *Analytical*
 782 *Sciences: The International Journal of the Japan Society for Analytical Chemistry*
 783 24:67–72. DOI: 10.2116/analsci.24.67.
- 784 Obokata H, Kojima K, Westerman K, Yamato M, Okano T, Tsuneda S, Vacanti CA. 2011.
 785 The potential of stem cells in adult tissues representative of the three germ layers.
 786 *Tissue Engineering. Part A* 17:607–615. DOI: 10.1089/ten.TEA.2010.0385.
- 787 Oh CE, Antes K, Darby M, Song S, Starkschall G. 1999. Comparison of 2D conventional, 3D
 788 conformal, and intensity-modulated treatment planning techniques for patients with
 789 prostate cancer with regard to target-dose homogeneity and dose to critical,
 790 uninvolved structures. *Medical Dosimetry: Official Journal of the American*

- 791 *Association of Medical Dosimetrists* 24:255–263. DOI: 10.1016/s0958-
- 792 3947(99)00030-8.
- 793 Okano T, Matsuda T. 1997. Hybrid muscular tissues: preparation of skeletal muscle cell-
- 794 incorporated collagen gels. *Cell Transplantation* 6:109–118. DOI: 10.1016/s0963-
- 795 6897(96)00255-2.
- 796 Ostrovidov S, Ahadian S, Ramon-Azcon J, Hosseini V, Fujie T, Parthiban SP, Shiku H,
- 797 Matsue T, Kaji H, Ramalingam M, Bae H, Khademhosseini A. 2017. Three-
- 798 dimensional co-culture of C2C12/PC12 cells improves skeletal muscle tissue
- 799 formation and function. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*
- 800 11:582–595. DOI: 10.1002/term.1956.
- 801 Patil P, Szymanski JM, Feinberg AW. 2016. Defined Micropatterning of ECM Protein
- 802 Adhesive Sites on Alginate Microfibers for Engineering Highly Anisotropic Muscle
- 803 Cell Bundles. *Advanced Materials Technologies* 1:1600003. DOI:
- 804 10.1002/admt.201600003.
- 805 Pedrotty DM, Koh J, Davis BH, Taylor DA, Wolf P, Niklason LE. 2005. Engineering skeletal
- 806 myoblasts: roles of three-dimensional culture and electrical stimulation. *American*
- 807 *Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 288:H1620-1626. DOI:
- 808 10.1152/ajpheart.00610.2003.
- 809 Penvose A, Westerman KA. 2012. Sca-1 is involved in the adhesion of myosphere cells to
- 810 $\alpha V\beta 3$ integrin. *Biology Open* 1:839–847. DOI: 10.1242/bio.20121222.
- 811 Post MJ. 2012. Cultured meat from stem cells: Challenges and prospects. *Meat Science*
- 812 92:297–301. DOI: 10.1016/j.meatsci.2012.04.008.
- 813 Powell CA, Smiley BL, Mills J, Vandeburgh HH. 2002. Mechanical stimulation improves
- 814 tissue-engineered human skeletal muscle. *American Journal of Physiology. Cell*
- 815 *Physiology* 283:C1557-1565. DOI: 10.1152/ajpcell.00595.2001.

- 816 Rao L, Qian Y, Khodabukus A, Ribar T, Bursac N. 2018. Engineering human pluripotent
 817 stem cells into a functional skeletal muscle tissue. *Nature Communications* 9:126.
 818 DOI: 10.1038/s41467-017-02636-4.
- 819 Rhim C, Lowell DA, Reedy MC, Slentz DH, Zhang SJ, Kraus WE, Truskey GA. 2007.
 820 Morphology and ultrastructure of differentiating three-dimensional mammalian
 821 skeletal muscle in a collagen gel. *Muscle & Nerve* 36:71–80. DOI:
 822 10.1002/mus.20788.
- 823 Rizzi R, Bearzi C, Mauretti A, Bernardini S, Cannata S, Gargioli C. 2012. Tissue engineering
 824 for skeletal muscle regeneration. *Muscles, Ligaments and Tendons Journal* 2:230.
- 825 Roche SM, Gumucio JP, Brooks SV, Mendias CL, Claflin DR. 2015. Measurement of
 826 Maximum Isometric Force Generated by Permeabilized Skeletal Muscle Fibers.
 827 *Journal of Visualized Experiments: JoVE*:e52695. DOI: 10.3791/52695.
- 828 Ross JJ, Tranquillo RT. 2003. ECM gene expression correlates with in vitro tissue growth and
 829 development in fibrin gel remodeled by neonatal smooth muscle cells. *Matrix Biology:*
 830 *Journal of the International Society for Matrix Biology* 22:477–490. DOI:
 831 10.1016/s0945-053x(03)00078-7.
- 832 Rosso F, Giordano A, Barbarisi M, Barbarisi A. 2004. From cell-ECM interactions to tissue
 833 engineering. *Journal of Cellular Physiology* 199:174–180. DOI: 10.1002/jcp.10471.
- 834 Sarig R, Baruchi Z, Fuchs O, Nudel U, Yaffe D. 2006. Regeneration and transdifferentiation
 835 potential of muscle-derived stem cells propagated as myospheres. *Stem Cells (Dayton,*
 836 *Ohio)* 24:1769–1778. DOI: 10.1634/stemcells.2005-0547.
- 837 Sasagawa T, Shimizu T, Sekiya S, Haraguchi Y, Yamato M, Sawa Y, Okano T. 2010. Design
 838 of prevascularized three-dimensional cell-dense tissues using a cell sheet stacking
 839 manipulation technology. *Biomaterials* 31:1646–1654. DOI:
 840 10.1016/j.biomaterials.2009.11.036.

- 841 Soliman E, Bianchi F, Sleigh JN, George JH, Cader MZ, Cui Z, Ye H. 2018. Engineered
 842 method for directional growth of muscle sheets on electrospun fibers. *Journal of*
 843 *Biomedical Materials Research. Part A* 106:1165–1176. DOI: 10.1002/jbm.a.36312.
- 844 Vandenburg HH. 1988. A computerized mechanical cell stimulator for tissue culture: effects
 845 on skeletal muscle organogenesis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology:*
 846 *Journal of the Tissue Culture Association* 24:609–619. DOI: 10.1007/BF02623597.
- 847 Wang L, Wu Y, Guo B, Ma PX. 2015. Nanofiber Yarn/Hydrogel Core-Shell Scaffolds
 848 Mimicking Native Skeletal Muscle Tissue for Guiding 3D Myoblast Alignment,
 849 Elongation, and Differentiation. *ACS nano* 9:9167–9179. DOI:
 850 10.1021/acsnano.5b03644.
- 851 Wei Y, Li Y, Chen C, Stoelzel K, Kaufmann AM, Albers AE. 2011. Human skeletal muscle-
 852 derived stem cells retain stem cell properties after expansion in myosphere culture.
 853 *Experimental Cell Research* 317:1016–1027. DOI: 10.1016/j.yexcr.2011.01.019.
- 854 Weinandy S, Laffar S, Unger RE, Flanagan TC, Loesel R, Kirkpatrick CJ, van Zandvoort M,
 855 Hermanns-Sachweh B, Dreier A, Klee D, Jockenhoevel S. 2014. Biofunctionalized
 856 microfiber-assisted formation of intrinsic three-dimensional capillary-like structures.
 857 *Tissue Engineering. Part A* 20:1858–1869. DOI: 10.1089/ten.TEA.2013.0330.
- 858 Westerman KA. 2015. Myospheres are composed of two cell types: one that is myogenic and
 859 a second that is mesenchymal. *PloS One* 10:e0116956. DOI:
 860 10.1371/journal.pone.0116956.
- 861 Westerman KA, Penvose A, Yang Z, Allen PD, Vacanti CA. 2010. Adult muscle “stem” cells
 862 can be sustained in culture as free-floating myospheres. *Experimental Cell Research*
 863 316:1966–1976. DOI: 10.1016/j.yexcr.2010.03.022.

- 864 Wolf MT, Dearth CL, Sonnenberg SB, Lobo EG, Badylak SF. 2015. Naturally derived and
865 synthetic scaffolds for skeletal muscle reconstruction. *Advanced Drug Delivery*
866 *Reviews* 84:208–221. DOI: 10.1016/j.addr.2014.08.011.
- 867 Yamamoto Y, Ito A, Fujita H, Nagamori E, Kawabe Y, Kamihira M. 2011. Functional
868 evaluation of artificial skeletal muscle tissue constructs fabricated by a magnetic
869 force-based tissue engineering technique. *Tissue Engineering. Part A* 17:107–114.
870 DOI: 10.1089/ten.TEA.2010.0312.
- 871 Yang L, van der Werf KO, Koopman BFJM, Subramaniam V, Bennink ML, Dijkstra PJ,
872 Feijen J. 2007. Micromechanical bending of single collagen fibrils using atomic force
873 microscopy. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A* 82:160–168. DOI:
874 10.1002/jbm.a.31127.
- 875