

FOREST, MARIE-ANNE

**UTILISATION DE LA THROMBINE ET DE LA  
FIBRINE POUR L'AMÉLIORATION DU SUCCÈS DE  
GREFFE DE MYOBLASTES CHEZ LE PATIENT  
ATTEINT DE DYSTROPHIE MUSCULAIRE DE  
DUCHENNE**

Mémoire présenté  
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval  
dans le cadre du programme de maîtrise en biologie cellulaire et moléculaire  
pour l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DE MÉDECINE  
UNIVERSITÉ LAVAL  
QUÉBEC

2009

## Résumé

La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est une maladie génétique héréditaire récessive atteignant un garçon sur 3500. Cette maladie est caractérisée par une dégénérescence musculaire progressive causée par l'absence d'expression de la protéine dystrophine. Afin de restaurer l'expression de la dystrophine dans le muscle, il est possible d'implanter des myoblastes sains, précurseurs myogéniques, dans les muscles du patient atteint de DMD.

Cependant, cette forme de thérapie se heurte encore à d'importants problèmes, notamment la mort précoce de 75 % à 80 % des cellules implantées dans les 5 premiers jours suivant la greffe. Afin de pallier à cela, nous avons tenté d'une part d'exploiter le potentiel mitogénique de la thrombine pour augmenter la prolifération de cellules saines *in vivo* et d'autre part d'utiliser le potentiel de la fibrine comme biomatrice à laquelle les myoblastes implantés peuvent s'attacher afin de contourner le phénomène de mort par anoïkis.

Bien qu'on ait pu démontrer que la thrombine ait bien un effet sur la prolifération des myoblastes *in vitro*, on a pas réussi à obtenir une amélioration du succès de greffe après 21 jours. L'implantation des myoblastes en gel de fibrine, quant à elle, a permis d'améliorer significativement la survie cellulaire à 5 jours suite à la greffe ainsi que le succès de la greffe de myoblastes après 21 jours chez la souris.

Ces résultats sont encourageants et démontrent qu'il y a bon espoir de rendre la thérapie cellulaire plus efficace. L'utilisation de produits non-immunogènes comme la thrombine et la fibrine pour favoriser la greffe myoblastes constitue donc une alternative intéressante pour le traitement des patients atteints de DMD.

## Abstract

Duchenne muscular dystrophy (dmd) is a recessive and hereditary genetic disease affecting one boy out of 3500. This disease is characterised by a progressive muscular loss caused by the absence of the expression of the dystrophin protein. To restore dystrophin expression in a dystrophic muscle, it is possible to implant myoblasts, myogenic precursor cells, coming from a healthy donor in the muscles of the patients suffering of DMD

However, this type of therapy still encounters some problems to its efficiency like the early death of 75 to 80 % of the implanted cells in the 5 days following the graft. To reduce the impact of early death, we tried to take advantage of the mitogenic potential of thrombin to stimulate cell proliferation *in vivo* and to use the potential of fibrin to act as a docking biomaterial to avoid death caused by anoikis.

As we succeeded in proving that thrombin is having an effect on myoblasts proliferation, we still have not succeeded in taking advantage of that property to enhance myoblast graft success. On the other hand, cell implantation in fibrin gels, allowed cell survival to be significantly improved at 5 days following the graft and the graft success to be significantly enhanced at 21 days after the implantation in mice.

This results show that it is possible to improve cellular therapy. Using non-immunogenic products like thrombin or fibrin to favorise myoblasts implantation is an interesting alternative for treatment of patients suffering of DMD.

## Remerciements

Je tiens à remercier chaleureusement le Dr Jacques-P. Tremblay pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et m'avoir ainsi permis de développer de nouvelles compétences ainsi que mon goût pour la recherche. Je remercie aussi tous les membres du laboratoire pour les échanges enrichissants, les conseils et les amitiés qui ont marqués ces deux ans.

Un merci particulier au Dr Catherine Gérard pour son aide autant pour la rédaction de ce mémoire que pour l'aide et l'expertise indispensables apportées lors des expérimentations effectuées. Merci aussi pour ta patience et pour avoir cru en mes projets.

Finalement, merci à ma famille et mes amis qui ont toujours cru en mes capacités et qui m'ont apporté un support souvent salutaire.

*Si l'idée n'est pas a priori absurde,  
elle est sans espoir.*

*- A. Einstein*

## Table des matières

Résumé.....	ii
Abstract.....	iii
Remerciements.....	iv
Table des matières .....	vi
Liste des figures .....	viii
INTRODUCTION GÉNÉRALE La dystrophie musculaire de Duchenne .....	2
1.1 Les phases de la maladie.....	2
1.2 Le muscle squelettique.....	3
1.2.1 La régénération musculaire.....	4
1.2.2 La dystrophine .....	5
1.3 Les traitements de la maladie.....	8
1.3.1 La thérapie pharmacologique.....	8
1.3.2 La thérapie génique.....	8
1.3.3 La thérapie cellulaire .....	8
1. Hypothèses et Objectifs .....	11
LA THROMBINE .....	13
3.1 Introduction.....	13
3.1.1 Le rôle de la thrombine dans la coagulation .....	13
3.1.2 Activation de la thrombine .....	14
3.1.3 Le rôle de la thrombine dans le développement musculaire.....	15
3.1.3.1 Élimination des synapses redondantes.....	15
3.1.3.2 Stimulation de la prolifération et inhibition de la fusion.....	16
3.1.4 Les récepteurs activés par les protéases.....	16
3.1.4.1 Activation de PAR-1 par la thrombine .....	17
3.1 Matériel et méthodes.....	19
3.1.1 Obtention de cellules à partir d'une biopsie .....	19
3.1.2 Culture cellulaire.....	20
3.1.3 Pré-traitement à la thrombine .....	20
3.1.4 Évaluation du pourcentage de viabilité par cytométrie de flux .....	20
3.1.5 Évaluation du taux de fusion par immunocytochimie .....	21
3.1.6 Évaluation de la prolifération par fluorescence .....	21
3.1.7 Évaluation de l'activité métabolique par colorimétrie.....	22
3.1.8 Greffe de myoblastes .....	23
3.1.9 Évaluation du succès de greffe par immunohistochimie .....	23
3.1.10 Analyse statistique .....	25
3.1.10.1 Test de Q.....	25
3.1.10.2 Test ANOVA.....	25
3.2 Résultats.....	26
3.3 Discussion.....	33
3.4 Conclusion et perspectives.....	36
LA FIBRINE.....	39
4.1 Introduction.....	39
4.1.1 Rôle de la fibrine.....	39
4.1.2 La formation de la fibrine. ....	39

4.1.3 Le gel de fibrine .....	40
4.1.4 La dégradation de la fibrine .....	41
4.2 Matériel et méthodes.....	43
4.2.1 Obtention de cellules à partir d'une biopsie .....	43
4.2.2 Culture de cellules humaines .....	43
4.2.3 Formation de gels de fibrine <i>in vitro</i> .....	43
4.2.4 Évaluation de l'activité métabolique par absorbance .....	43
4.2.5 Greffe de myoblastes .....	44
4.2.6 Évaluation du succès de greffe par immunohistochimie .....	44
4.2.7 Évaluation de la mortalité <i>in vivo</i> .....	44
4.2.8 Analyse statistique .....	45
4.3 Résultats.....	46
4.4 Discussion.....	51
4.5 Conclusions et perspectives.....	54
CONCLUSION GÉNÉRALE.....	56
ANNEXE .....	57
Bibliographie .....	58

## Liste des figures

Figure 1 : Signes de la maladie.....	3
Figure 2 : Structure anatomique du muscle squelettique.....	4
Figure 3 : Structure des protéines de la famille de la dystrophine.....	6
Figure 4 : Le complexe de la dystrophine dans le muscle squelettique.....	6
Figure 5 : Immunohistochimie dirigée contre la dystrophine humaine.....	7
Figure 6 : Les limites de la thérapie cellulaire dans le traitement contre la DMD.....	10
Figure 7 : Structure et domaines de la prothrombine et de la thrombine.....	13
Figure 8 : Cascade de la coagulation.....	14
Figure 9 : Formes active ( $\alpha$ ) et inactives ( $\beta$ et $\gamma$ ) de la thrombine.....	15
Figure 10 : Influence de la thrombine et des récepteurs PAR au cours de la différenciation du myoblaste en fibre musculaire.....	16
Figure 11 : Activation du récepteur PAR-1 par la thrombine.....	17
Figure 12 : Indice de fusion des myoblastes exprimé en pourcentage de noyaux colocalisant avec la MHC.....	27
Figure 13 : Quantité d'ADN présent.....	28
Figure 14 : Activité métabolique des myoblastes.....	29
Figure 15 : Pourcentage de cellules viables.....	31
Figure 16 : Succès de greffe.....	32
Figure 17 : Structures moléculaires du fibrinogène et de la fibrine.....	40
Figure 18 : Morphologie des myoblastes cultivés en gel de fibrine.....	46
Figure 19 : Activité métabolique des myoblastes.....	47
Figure 20 : Succès de greffe.....	49
Figure 21 : Survie cellulaire.....	50

## Liste des abréviations

DMD : Dystrophie musculaire de Duchenne

HGF : Facteur de croissance des hépatocytes

ADN : Acide désoxyribonucléique

FII : Facteur II, prothrombine

FII<sub>a</sub> : Facteur II activé, thrombine

FX<sub>a</sub> : Facteur X activé

PAR : Récepteur activé par les protéases

Ca<sup>2+</sup> : Ions calcium

HBSS : Hank's balanced salt solution

PBS : Phosphate buffered saline

P/S : Pénicilline et strptomycine

FBS : Sérum foetal bovin

bFGF : Facteur de croissance de base des fibroblastes

CD : Antigène de différenciation

rpm : Rotations par minute

PI : Propidium ioide

DAPI : 4'-6-Diamidino-2-phenylindol

Ig : Immunoglobuline

MHC : Chaîne lourde de la myosine

MTT : 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl térasodium bromide

HCl : Chlorure d'hydrogène

SCID : Severe combined immunodeficiency disease

BSA : Albumine de sérum bovin

FXIII : Facteur XIII

FXIII<sub>a</sub> : Facteur XIII activé

XTT : 2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide inner salt

PMS : Phenazine methosulfate

CaCl<sub>2</sub> : Chlorure de calcium

SDS : Sodium dodecyl sulfate

RAG : Recombination-activating gene

RT-PCR : Reverse transcriptase polymerase chain reaction

**- INTRODUCTION GÉNÉRALE -**  
**La dystrophie musculaire de Duchenne**

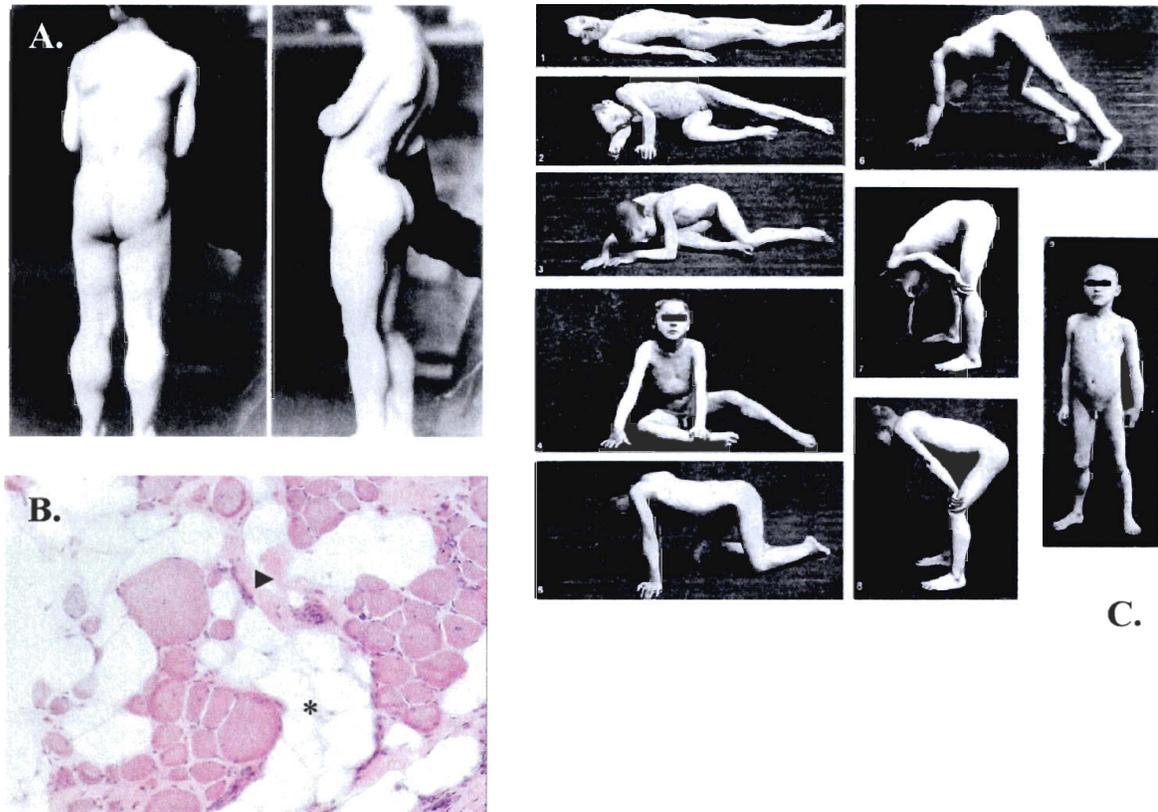
# INTRODUCTION GÉNÉRALE

## La dystrophie musculaire de Duchenne

La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est une maladie récessive liée au chromosome X et atteignant un garçon sur 3500. Elle se manifeste très tôt dans l'enfance et se caractérise par une atteinte musculaire due à l'absence de la dystrophine (Tortora and Grabowski 2002).

### 1.1 Les phases de la maladie

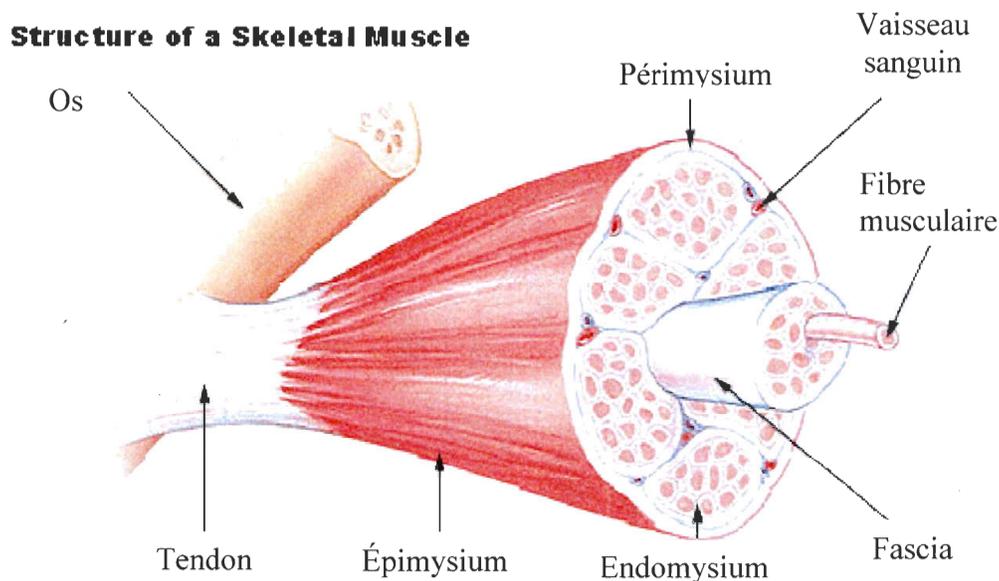
Les premiers signes de la maladie se manifestent vers deux ans, ce qui correspond à la phase précoce. À cette étape, on voit apparaître des difficultés motrices, une certaine faiblesse musculaire et une pseudo-hypertrophie musculaire due à une adipose et une fibrose musculaire (Figure 1 A et B.). Vers l'âge de six ans débute la phase dite transitionnelle au cours de laquelle on peut observer la manœuvre de Gowers (Figure 1 C), c'est-à-dire que l'enfant doit utiliser ses membres supérieurs pour être capable de se relever. C'est un signe typique de la DMD. De plus, l'enfant ressent une fatigue générale et a besoin d'aide pour se déplacer (Tyler 2003). Vers l'âge de dix ans, on peut observer une phase de perte de mobilité souvent associée au développement d'une scoliose (Figure 1 A) ainsi qu'à des difficultés à effectuer des activités quotidiennes. C'est aussi au cours de cette période que l'enfant devra utiliser une chaise roulante pour se déplacer. Dépassé quinze ans, des complications cardiaques et respiratoires se manifestent. Le décès arrive le plus souvent entre l'âge de vingt et trente ans (PPMD 2008).



**Figure 1 : Signes de la maladie** A. Photographie d'un patient atteint de DMD présentant une pseudohypertrophie des membres inférieurs. B. Coupe histologique d'un muscle de patient atteint de DMD. ► Fibrose \* Adipose. C. Manoeuvre de Gowers. (Tyler 2003)

## 1.2 Le muscle squelettique

Par opposition au muscle cardiaque et au muscle lisse, le muscle strié squelettique est un muscle dont le mouvement est volontaire. Les fibres musculaires sont de longues cellules multinucléées délimitées par une membrane. Ces fibres sont séparées par un tissu conjonctif appelé endomysium. Ces fibres sont regroupées en faisceaux musculaires délimités par le périmysium et s'organisent en un muscle délimité lui aussi par un tissu conjonctif nommé épimysium (Figure 2). En périphérie des fibres musculaires, on retrouve les cellules satellites qui sont les cellules souches des muscles intervenant dans la régénération musculaire (voir section 1.2.1 La régénération musculaire) (Tortora and Grabowski 2002).



**Figure 2 : Structure anatomique du muscle squelettique.** Les fibres musculaires sont délimitées par l'endomysium et s'organisent en faisceaux délimités par le péri-mysium s'organisant eux-mêmes en muscles délimités par l'épimysium. Les muscles sont rattachés aux os par les tendons (SEER 2009).

### 1.2.1 La régénération musculaire

La régénération musculaire est induite par un bris de la fibre musculaire. Peu de régénération musculaire est engendrée par les activités quotidiennes (Voir section 1.2.2). Dans un muscle sain, ce processus est plutôt activé par un trauma tel qu'une intense activité physique ou une coupure profonde (Charge and Rudnicki 2004).

Lors d'un bris musculaire, plusieurs facteurs de croissance sont libérés au site endommagé tels le facteur de croissance des fibroblastes (FGF), les facteurs de croissance semblables à l'insuline (IGF-I et -II) ou le facteur de croissance des hépatocytes (HGF) ainsi que des cytokines comme l'interleukine-6 (IL-6). Ces facteurs activent les cellules satellites, habituellement quiescentes, et les amènent à proliférer et à se différencier en myoblastes. Ce sont ces myoblastes qui vont fusionner avec les fibres musculaires endommagées afin de reformer une fibre musculaire. Ces myoblastes nouvellement différenciés ont aussi la capacité de fusionner entre-eux pour former des nouvelles fibres, mais ce phénomène est

moins fréquent *in vivo* (Greffe, Kuijpers-Jagtman et al. 2007; Le Grand and Rudnicki 2007).

Les cellules satellites, comme toutes les cellules souches, ont la capacité de s'auto-renouveler. Par contre, avec le temps et la multitude des bris, la réserve de cellules satellites ainsi que leur activité diminuent entraînant une diminution de la capacité de réparation musculaire. Ceci favorise la formation de fibrose (Le Grand and Rudnicki 2007). La fibrose est induite par une formation excessive de matrice extra-cellulaire par les myofibroblastes. La majorité des bris musculaires se réparent sans formation de fibrose, mais, lorsque présent, ce phénomène peut nuire à la bonne régénération musculaire (Greffe, Kuijpers-Jagtman et al. 2007).

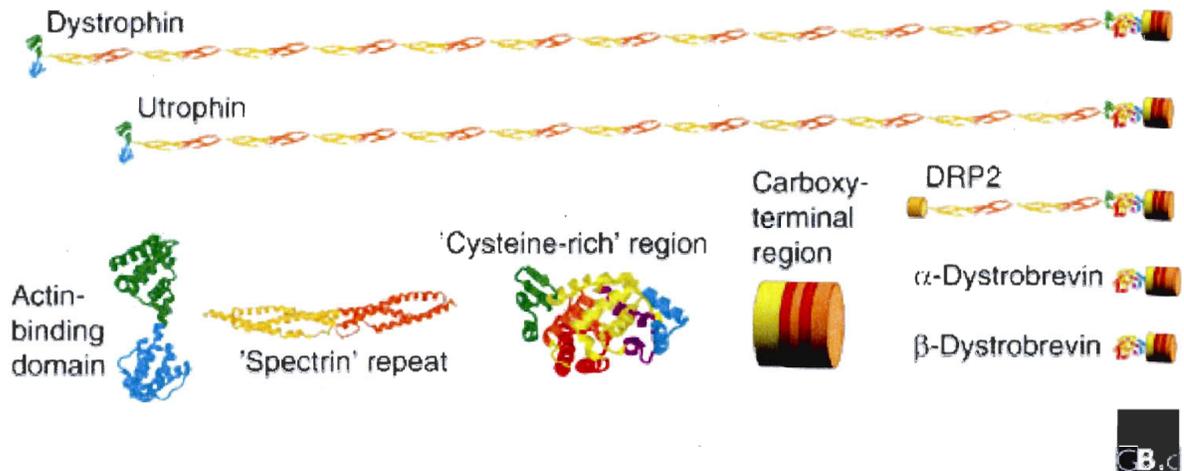
### 1.2.2 La dystrophine

Le gène de la dystrophine est localisé sur le bras court du chromosome X. Il est long de 2,4 mégabases, ce qui en fait le gène le plus long du génome humain, et code pour une protéine de 427 Kd. Il comprend 79 exons et sept promoteurs spécifiques à un tissu ont été identifiés générant des molécules de différentes longueurs et/ou ayant une extrémité N-terminale différente (Roberts 2001).

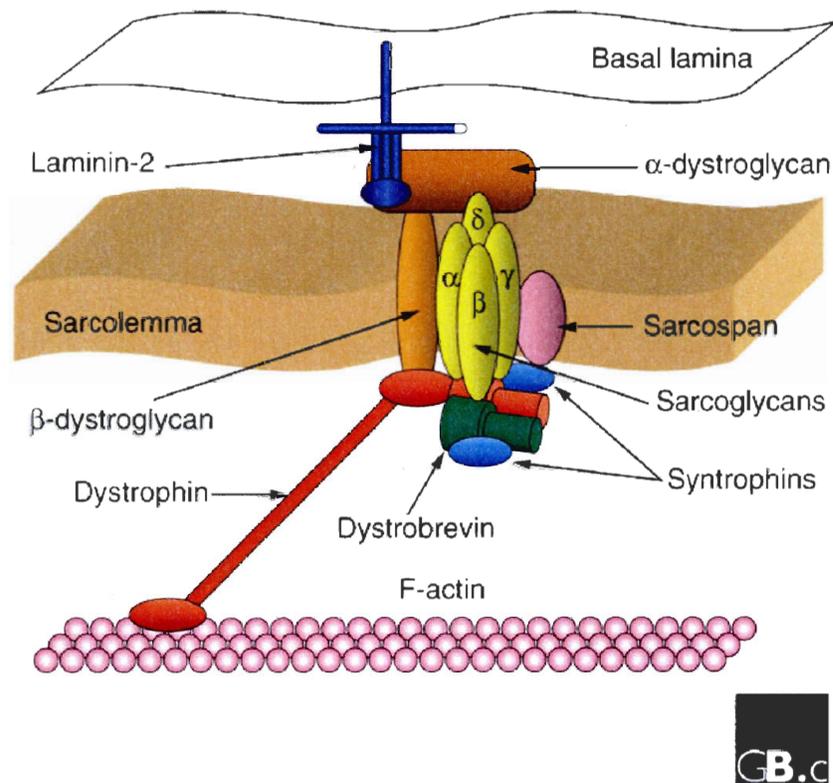
L'utrophine est une molécule très similaire à la dystrophine, mais 7 % plus courte et assume le rôle de celle-ci pendant la vie embryonnaire. Elle est présente en faible quantité chez l'adulte, mais exerce un rôle fonctionnel semblable (Roberts 2001).

La dystrophine est composée de quatre domaines : un domaine se liant à l'actine, un domaine tige (*rod domain*) composé de répétitions de domaines spectrines constituant 70 % de la protéine, une région riche en cystéine et le domaine carboxy-terminal (Figure 3).

La dystrophine a une localisation subsarcolemmique liant l'actine à un complexe de protéines membranaires (Figure 5 A). Plus précisément, elle s'associe avec les dystroglycans eux-mêmes associés à la laminine-2 (Figure 4) (Roberts 2001). Le rôle de la dystrophine est d'assurer l'intégrité musculaire en rendant le sarcolemme plus stable (Winder 1997).



**Figure 3 : Structure des protéines de la famille de la dystrophine.** La dystrophine se compose d'une région liant l'actine suivie de répétitions du domaine spectrine et se termine par une région riche en cystéine et un domaine carboxy-terminal (Roberts 2001).



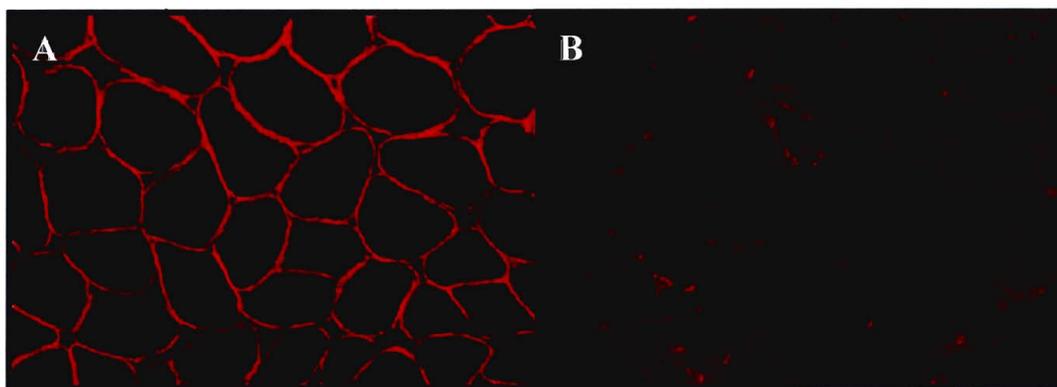
**Figure 4 : Le complexe de la dystrophine dans le muscle squelettique.** La dystrophine relie l'actine aux dystroglycans jouant ainsi un rôle clé dans le complexe protéique assurant l'intégrité du sarcolemme (Roberts 2001).

### 1.2.2.1 Les mutations dans la dystrophine

C'est lorsqu'une mutation dans le gène de la dystrophine mène à l'absence de production de la protéine fonctionnelle qu'on parle de DMD (Figure 5 B). L'absence de dystrophine entraîne une fragilité musculaire accrue. Cet accroissement de la fragilité musculaire chez le patient DMD entraîne des bris musculaires plus fréquents à la suite desquels la réserve des cellules satellites s'épuise rapidement suite aux cycles de régénération répétés (Voir section 1.2.1).

La mutation est spontanée dans le tiers des cas, le reste du temps elle est transmise de manière récessive (PPMD 2008). La mutation est dans environ 60 % des cas de mutation transmise génétiquement, il s'agit d'une grande délétion ou insertion entraînant un décalage dans le cadre de lecture. Dans les 40 % restants, on retrouve des mutations ponctuelles ou de petits réarrangements du cadre de lecture (Nowak and Davies 2004) .

Il est aussi possible que la mutation n'entraîne pas un décalage du cadre de lecture, mais mène à la production d'une dystrophine tronquée et peu fonctionnelle ou d'une trop faible quantité de dystrophine. On parle alors de dystrophie musculaire de Becker (PPMD 2008).



**Figure 5 : Immunohistochimie dirigée contre la dystrophine humaine.** Chez un patient sain. On peut observer la localisation membranaire de la dystrophine retrouvée dans l'ensemble des fibres musculaire (A). Chez un patient atteint de DMD. Le muscle ne présente aucune dystrophine (B).

## **1.3 Les traitements de la maladie**

Jusqu'à maintenant, les seuls traitements pharmacologiques disponibles pour traiter la DMD sont palliatifs. Cependant, plusieurs thérapies ayant pour but de restaurer l'expression d'une dystrophine fonctionnelle sont à l'étude. Celles-ci se divisent en trois grands axes : la thérapie pharmacologique, la thérapie génique et la thérapie cellulaire.

### **1.3.1 La thérapie pharmacologique**

Majoritairement, on utilise des corticostéroïdes comme la prednisone et le déflazacort pour traiter les patients atteints de DMD. Ces médicaments permettent de réduire l'inflammation et peuvent allonger la période durant laquelle le patient est capable de se déplacer. Par contre, ces médicaments entraînent des effets secondaires importants comme l'ostéoporose ou la rétention d'eau (Skuk, Vilquin et al. 2002).

### **1.3.2 La thérapie génique**

La thérapie génique consiste à introduire un gène codant pour une dystrophine fonctionnelle ou à corriger celui-ci directement dans les cellules du patient. On peut introduire un nouveau gène en utilisant comme vecteur des virus ou des plasmides ou encore utiliser un ADN nu. Pour corriger le gène déficient, on peut utiliser le saut d'exon : stratégie dans laquelle on utilise des nucléotides anti-sens pour retirer un exon complet et ainsi rétablir le cadre de lecture si la mutation comprend l'insertion ou la délétion d'un nucléotide entraînant un codon stop prématuré (Skuk, Vilquin et al. 2002).

### **1.3.3 La thérapie cellulaire**

La thérapie cellulaire consiste à introduire dans le muscle du patient atteint de DMD des cellules musculaires provenant d'un patient non-atteint permettant ainsi de restaurer l'expression de dystrophine dans leurs muscles. Ces cellules peuvent soit provenir d'un donneur ou être des cellules autologues dont le gène de la dystrophine a été corrigé par thérapie génique *ex vivo*.

Deux formes de cette thérapie sont présentement à l'étude ; l'injection intra-artérielle de cellules, notamment de mésoangioblastes (Sampaolesi, Blot et al. 2006; Peault, Rudnicki et al. 2007) ou l'injection intramusculaire de cellules, notamment de myoblastes (Peault, Rudnicki et al. 2007). Les mésangioblastes sont des cellules isolées à partir de vaisseaux sanguins. Ces cellules peuvent être injectées de manière intra-artérielle, passer la paroi vasculaire et se diriger vers le muscle pour finalement se différencier en cellules musculaires (Peault, Rudnicki et al. 2007). L'injection intramusculaire de myoblastes permet d'introduire dans le muscle dystrophique des cellules précurseurs exprimant une dystrophine non-mutée qui se fusionneront avec les fibres musculaires endommagées du patient. Des essais *in vivo* ont été effectués sur des animaux et on a même procédé à des essais cliniques (Skuk, Vilquin et al. 2002; Skuk, Goulet et al. 2007).

#### **1.3.3.1 Les limites de la thérapie cellulaire**

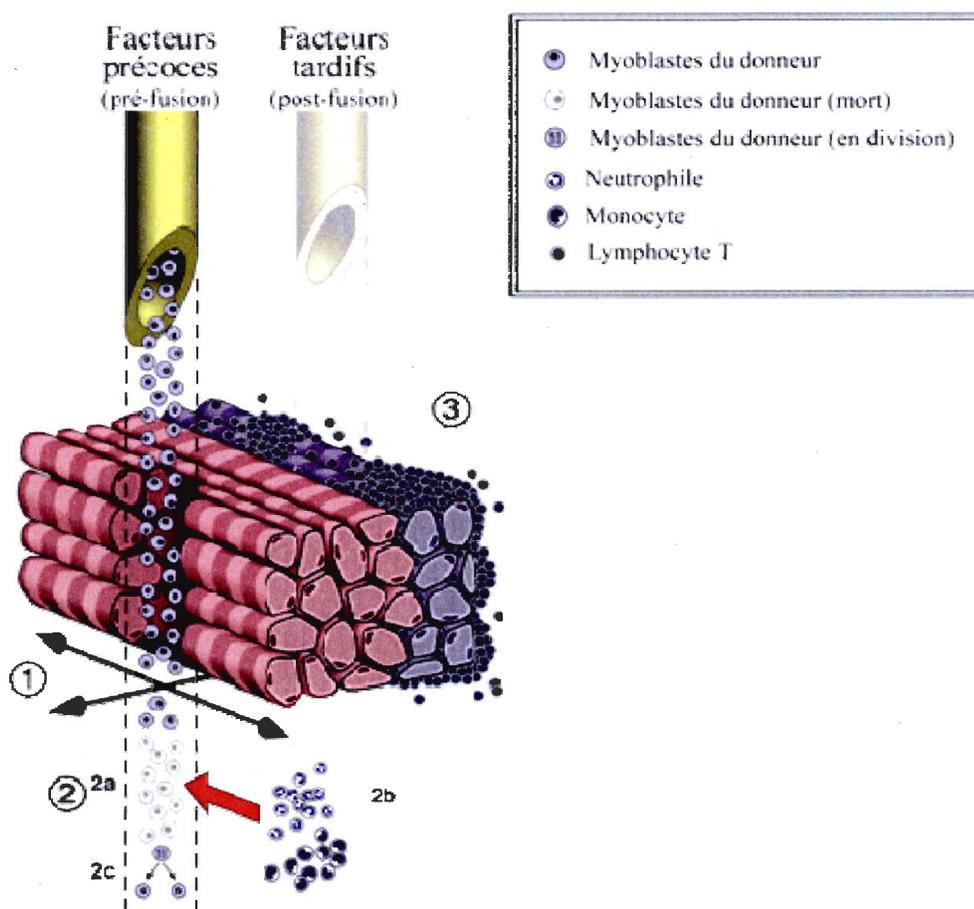
Les résultats n'ont cependant pas été aussi intéressants qu'escompté et ce dû à trois causes majeures : la faible migration des cellules, la mort précoce de celles-ci et le rejet immunitaire (Figure 6).

La faible migration des cellules (Figure 6 (1)) est un problème puisque les cellules injectées se concentrent aux sites d'injection leur migration se limitant à moins de 500  $\mu\text{m}$ . (Skuk and Tremblay 2001; Tremblay and Vilquin 2001) Physiquement limitées, les myoblastes ne se fusionnent donc que ponctuellement aux lieux d'injection. Pour obtenir une expression de dystrophine dans l'ensemble du muscle, il faut donc effectuer une multitude d'injections très rapprochées (100 injections par  $\text{cm}^2$ ) (Peault, Rudnicki et al. 2007). L'amélioration de la migration cellulaire *in vivo* permettrait donc de réduire le nombre d'injection à effectuer lors de la greffe.

Beaucoup de cellules meurent de manière précoce suite à l'implantation. (Figure 6 (2a)) En effet, de 75 % à 80 % des cellules meurent dans les cinq premiers jours suivant l'implantation (Skuk and Tremblay 2001; Tremblay and Vilquin 2001; Peault, Rudnicki et al. 2007). Ceci est probablement dû à l'action des neutrophiles, cellules immunitaires, qui sont activés par l'inflammation causée par la greffe (Figure 6 (2b)). La mort précoce des cellules est aussi, en partie, due à l'anoïkis, c'est-à-dire le manque d'attachement à la

matrice extra-cellulaire (Bouchentouf, Benabdallah et al. 2007). Par contre, la mort précoce des cellules peut être compensée par la prolifération des cellules implantées *in vivo* au fil du temps. (Figure 6 (2c))

On peut aussi observer un rejet immunitaire, ou rejet de greffe (Figure 6 (3)), envers les cellules du donneur. En effet, l'organisme reconnaît les cellules injectées comme un corps étranger ou non-soi. Ce phénomène peut être contourné par l'administration d'immunosuppresseurs, notamment le FK506 (Peault, Rudnicki et al. 2007). Par contre, l'utilisation d'immunosuppresseurs à long terme augmente le risque de contracter des infections et le risque de cancers (Skuk and Tremblay 2001).



**Figure 6 : Les limites de la thérapie cellulaire dans le traitement contre la DMD. (1)** Faible dispersion des cellules depuis le site d'injection **(2)** Mort précoce des cellules **a.** Cellules mortes **b.** Neutrophiles **c.** Division cellulaire compensatoire *in vivo* **3.** Rejet immunitaire contre les myoblastes implantés (Skuk, 2001).

## 1. Hypothèses et Objectifs

L'objectif de travail a été de contourner le phénomène de mort précoce des cellules lors de la thérapie cellulaire dans le cadre de la DMD et ce de deux manières :

- D'abord, le phénomène de mort précoce peut être pallié par une stimulation des cellules à continuer de proliférer *in vivo*. Ainsi, le nombre de cellules mortes au moment de la greffe serait éventuellement compensé par la prolifération. Nous avons donc tenté d'inhiber de manière transitoire la fusion *in vivo* au profit de la prolifération cellulaire en mettant les myoblastes en présence de thrombine. Les cellules pourront donc proliférer durant une période plus longue et, une fois l'effet de la thrombine terminé, récupérer leur capacité régulière de fusion et aller s'intégrer aux fibres n'exprimant pas de dystrophine.
- Ensuite, nous avons tenté de contourner le problème de la mort par anoïkis en offrant aux cellules un support matriciel afin que celles-ci puissent profiter de l'attachement dont elles ont besoin. Pour ce faire, nous avons implanté les myoblastes en suspension dans un gel de fibrine.

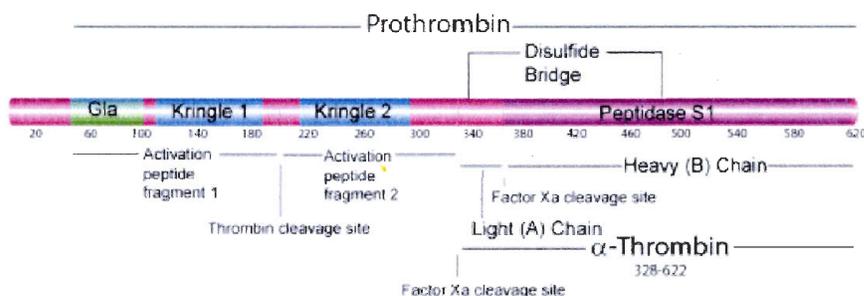
Dans une première section, le projet concernant l'utilisation de thrombine sera abordé suivi d'une seconde section concernant l'utilisation de la fibrine.

**- LA THROMBINE -**

# LA THROMBINE

## 3.1 Introduction

La thrombine catalytiquement active ou  $\alpha$ -thrombine ou facteur II activé (FII<sub>a</sub>) est composée de deux chaînes polypeptidiques : la chaîne A légère (6000 kDa) et la B lourde (31 000 kDa) liées par un pont disulfure. La chaîne B porte la partie protéolytique (Figure 7). La prothrombine (FII) ou molécule précurseur de la thrombine est présente à environ 5-10 mg/dL dans le plasma sanguin (Sigma-Aldrich 2009).

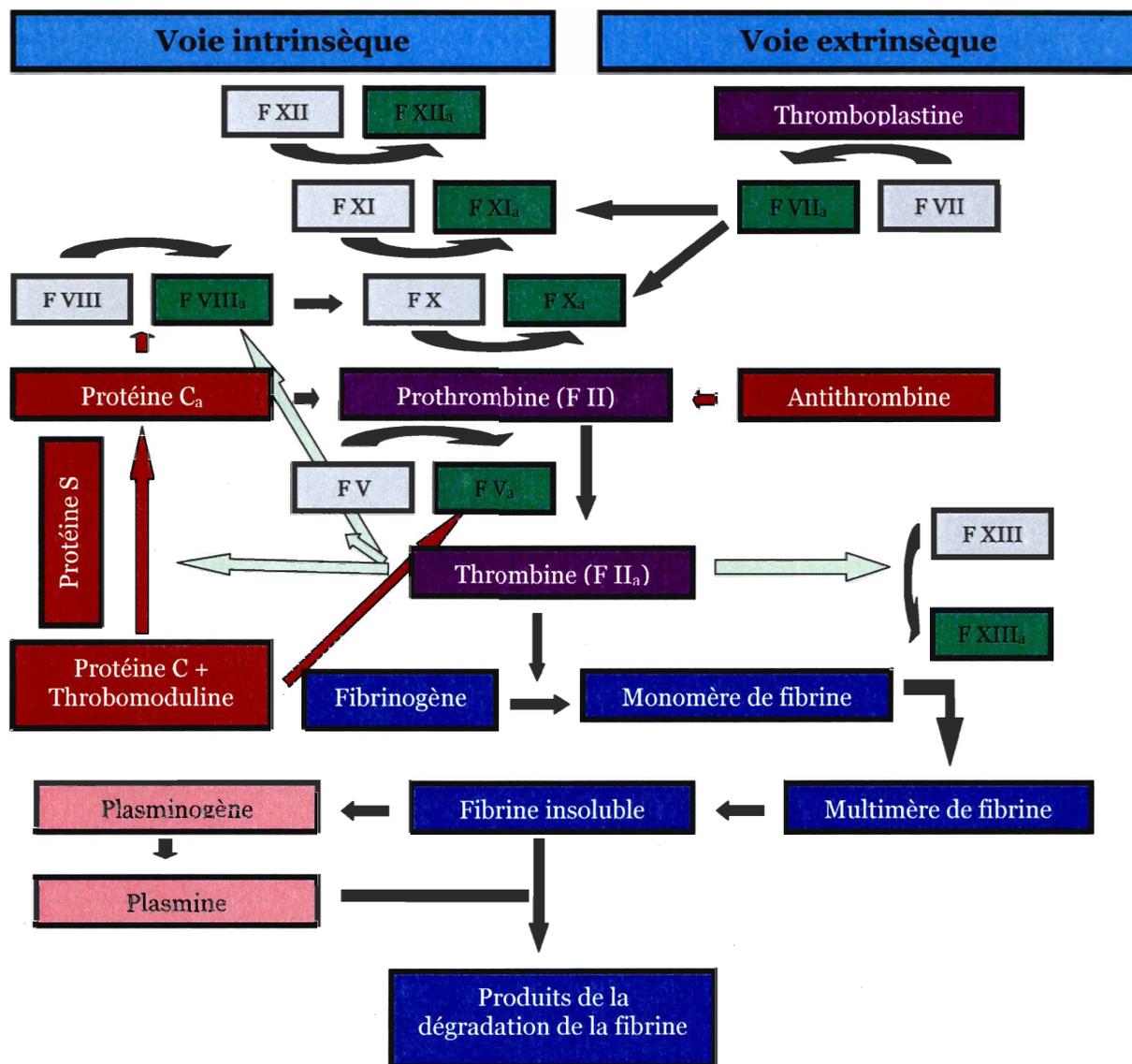


**Figure 7 : Structure et domaines de la prothrombine et de la thrombine.** La chaîne légère (ou chaîne A) et la chaîne lourde (ou chaîne B) de la prothrombine correspondent à la molécule de thrombine. Le site de clivage activateur du FII par le FX<sub>a</sub> se situe au début de la chaîne A (Sigma-Aldrich 2009).

### 3.1.1 Le rôle de la thrombine dans la coagulation

La thrombine possède un rôle procoagulant : elle clive le fibrinogène pour former le caillot physiologique (caillot de fibrine). C'est ce caillot qui permet de colmater le vaisseau sanguin endommagé lors d'une hémorragie. Elle contribue aussi à l'agrégation plaquettaire et la stabilisation du caillot via l'activation du facteur XIII ainsi qu'à un feedback positif sur l'activation des facteurs V, VIII et XI qui, pour leur part, activent la prothrombine en thrombine (Figure 8) (Di Cera, Dang et al. 1997).

La thrombine exerce aussi des effets sur d'autres tissus comme, par exemple, l'endothélium vasculaire, le cerveau ou le muscle squelettique, via les récepteurs activés par les protéases (PARs) notamment PAR-1 (voir Annexe) (Macfarlane, Seatter et al. 2001).

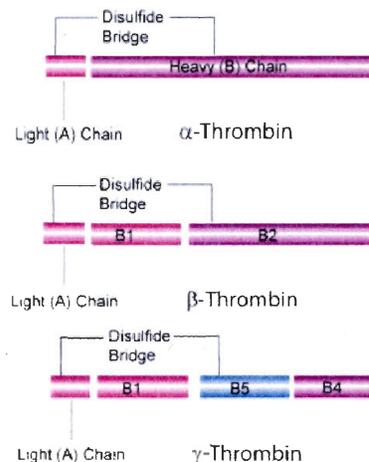


**Figure 8 : Cascade de la coagulation** ou formation du caillot physiologique. Le «a» en indice signifie que le facteur est activé. Les flèches vertes représentent une rétroaction positive et les flèches rouges une rétroaction négative.

### 3.1.2 Activation de la thrombine

La thrombine est une sérine protéase circulant sous forme de zymogène ; la prothrombine (FII). L'activation du FII est initiée lors de l'activation de la cascade de la coagulation

(Figure 8). Le clivage est effectué par le complexe prothrombinase composé des facteurs  $X_a$  et  $V_a$  et en présence d'ions  $Ca^{2+}$  (Orfeo, Brummel-Ziedins et al. 2008). Ce clivage produit majoritairement de l' $\alpha$ -thrombine, mais des clivages subséquents peuvent aussi mener à la production de  $\beta$ - ou de  $\gamma$ -thrombine (Figure 9). Ces deux dernières formes ne possèdent pas d'activité catalytique. Son activité est inhibée majoritairement par l'antithrombine III et le cofacteur de l'héparine II (Bode 2006), mais peut aussi l'être par certaines drogues comme l'hirudine (Greinacher and Warkentin 2008).



**Figure 9 : Formes active ( $\alpha$ ) et inactives ( $\beta$  et  $\gamma$ ) de la thrombine.** Les formes inactives de la thrombine sont créées par des clivages supplémentaires sur la forme active de la thrombine au niveau de la chaîne lourde (c'est-à-dire au niveau du site protéolytique) (Sigma-Aldrich 2009).

### 3.1.3 Le rôle de la thrombine dans le développement musculaire

La thrombine ainsi que son récepteur sont présents dans le muscle à un taux variant selon le degré de différenciation des cellules musculaires. (Chevessier, Hantai et al. 2001)

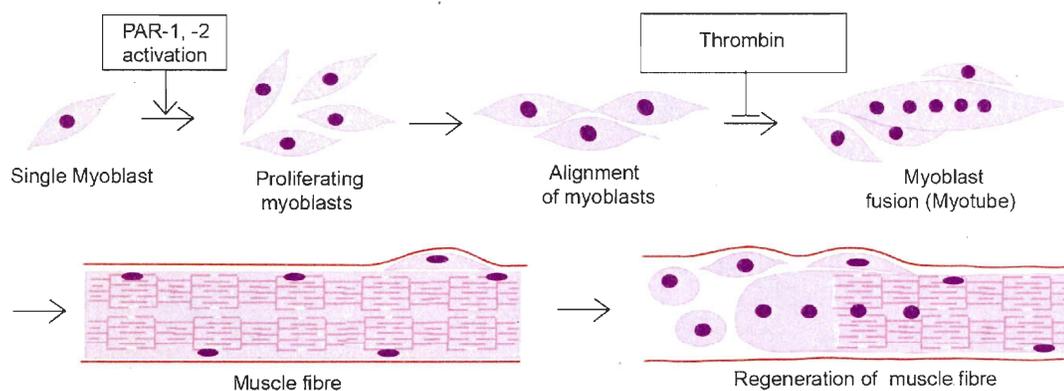
#### 3.1.3.1 Élimination des synapses redondantes

*In vivo*, la thrombine contribue à l'élimination des synapses redondantes (ADPSE). À l'état embryonnaire, le muscle présente en effet un grand nombre de jonctions neuromusculaires par fibre musculaire ce qui a pour effet d'avoir une innervation redondante. Au cours de la vie postnatale, ces jonctions neuromusculaires redondantes seront progressivement

éliminées. Ceci a pu être déterminé par l'étude des taux de la thrombine, de son récepteur (PAR-1) et d'un inhibiteur de la thrombine, la protéase-nexine 1 (PN-1) (Mackie, Loh et al. 2008).

### 3.1.3.2 Stimulation de la prolifération et inhibition de la fusion

En culture, il a été observé que la présence de thrombine stimule la prolifération des myoblastes tout en inhibant leur fusion (Figure 10). Ces deux phénomènes sont complémentaires puisqu'une cellule musculaire fusionnée est en fait une cellule différenciée en myotubes et que les cellules musculaires différenciées perdent leur capacité à proliférer. L'action de la thrombine pousse les cellules musculaires à rester dans un état moins différencié. Ceci a été confirmé par une baisse d'expression de la chaîne lourde de la myosine (MHC) qui est un marqueur classique de la différenciation musculaire (Mackie, Loh et al. 2008).



**Figure 10 : Influence de la thrombine et des récepteurs PAR au cours de la différenciation du myoblaste en fibre musculaire.** L'activation des PAR-1 et -2, notamment par la thrombine, entraîne une prolifération accrue des myoblastes. La thrombine a aussi une action inhibitrice sur la fusion des myoblastes en myotubes (Mackie, Loh et al. 2008).

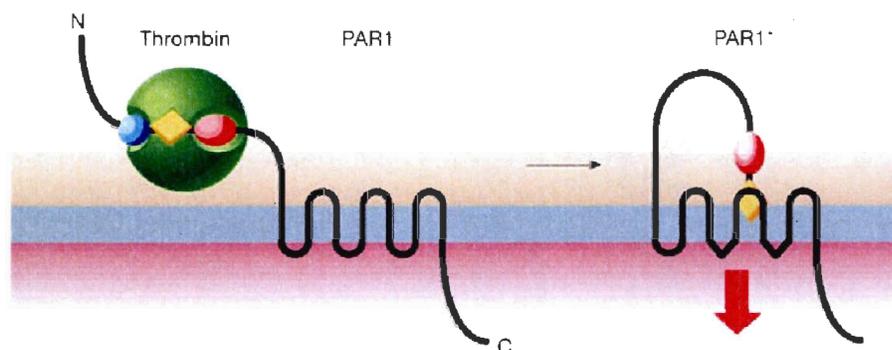
### 3.1.4 Les récepteurs activés par les protéases

Les récepteurs activés par les protéases sont des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR). Quatre PARs sont connus soit PAR-1, -2, -3 et -4. Alors que PAR-1, -3 et -4 peuvent être activés par la thrombine, PAR-2 est plutôt activé par la trypsine, la tryptase

ainsi que par les facteurs de la coagulation VII<sub>a</sub> et X<sub>a</sub>. L'expression des différents PARs varie d'un tissu et d'une espèce à l'autre. Les myoblastes expriment PAR-1 et -2 tandis que les fibres musculaires expriment en plus PAR-1, -2, et -4 (Coughlin 2000; Mackie, Loh et al. 2008)

### 3.1.4.1 Activation de PAR-1 par la thrombine

PAR-1 est le récepteur classique de la thrombine (de son ancien nom, récepteur de la thrombine). En fait, la thrombine n'est pas en tant que tel le ligand du PAR-1, mais sert plutôt à découvrir le ligand. En effet, le PAR-1 est porteur de son propre ligand. Le rôle de la thrombine est de cliver l'extrémité N-terminale du récepteur entre l'arginine 41 et la sérine 42 pour ainsi découvrir la séquence-ligand (le peptide SFLLRN). La nouvelle extrémité N-terminale ira activer le récepteur en se liant à la seconde boucle extra-cellulaire du récepteur (Figure 11) (Coughlin 2000).



**Figure 11 : Activation du récepteur PAR-1 par la thrombine.** L'action protéolytique de la thrombine sur le récepteur permet la libération du peptide-ligand qui va aller activer le récepteur en se liant à la seconde boucle extra-cellulaire de celui-ci. La grande sphère verte représente la thrombine, les petites sphères rose et bleue délimitent la séquence reconnue par la thrombine et le diamant jaune représente le peptide-ligand SFLLRN (Coughlin 2000).

Suite à l'activation du récepteur, la séquence-ligand reste liée au récepteur et ceci est irréversible. Par conséquent, le récepteur ne peut être recyclé et est dégradé par les lysosomes. (Coughlin 2000)

L'effet mitogénique de la thrombine sur les myoblastes pourrait donc être exploité afin de stimuler les cellules à proliférer *in vivo* suite à la greffe dans le cadre d'une thérapie cellulaire chez le patient atteint de DMD. La stimulation de la prolifération étant transitoire, les myoblastes retrouveraient donc ensuite leur pouvoir de fusion avec les fibres musculaires endommagées. La mort cellulaire ne serait pas diminuer, mais la prolifération induite *in vivo* permettrait de rendre disponibles plus de cellules positives pour la dystrophine ayant le pouvoir de se fusionner aux fibres musculaires négatives pour la dystrophine et ainsi augmenter le succès de la greffe.

## **3.2 Matériel et méthodes**

### **3.2.1 Obtention de cellules à partir d'une biopsie**

Les myoblastes humains ont été obtenus à partir d'une biopsie musculaire provenant d'un homme de 23 ans. Le muscle émincé est lavé à l'HBSS (Hank's balanced salt solution, GIBCO). Il est ensuite transféré dans un bioréacteur et est incubé à 37°C pendant une heure dans une solution de 8,4 g de dispase (Roche) et de 20 mg de collagénase (GIBCO) resuspendues dans 10 mL de HBSS. L'action protéolytique de ces enzymes est arrêtée par l'ajout d'un volume équivalent (soit 10 mL) de milieu de culture complet soit un milieu MB-1 (HyClone) additionné de 15 % de sérum fœtal bovin (FBS, GIBCO), de 1 % de pénicilline/streptomycine (P/S, GIBCO) et de 20 µL de facteur de croissance de base des fibroblastes (bFGF, Feldan) [10 ng/mL]. Le tout est centrifugé 5 minutes à 1400 rpm (Damon). Le surnageant est mis de côté pour une étape ultérieure. Le culot est rincé à l'HBSS et subit une seconde digestion de 45 minutes à 37°C dans 10 mL de trypsine. L'action protéolytique de la trypsine est arrêtée par l'ajout d'un volume équivalent (soit 10 mL) de milieu de culture MB-1 complet. Le tout est centrifugé 5 minutes à 1400 rpm (Damon) et le surnageant est ajouté à celui qui avait été précédemment réservé. Le culot, composé de débris cellulaires, est rejeté.

Les deux surnageants contiennent les cellules qui sont alors mises en culture pour une période de deux heures. Ceci a pour but d'épurer les myoblastes. En effet, au cours de ces deux heures, les fibroblastes auront le temps d'adhérer à la surface du pétri de culture alors que les myoblastes seront toujours en suspension dans le milieu. Le milieu est alors récupéré et réensemencé dans de nouvelles boîtes. Les boîtes contenant les fibroblastes adhérents sont jetées. La culture des myoblastes se poursuit jusqu'à confluence des cellules.

La pureté de la culture cellulaire est ensuite contrôlée en évaluant par cytométrie de flux le pourcentage de cellules exprimant NKH-1 – PE (un anticorps dirigé contre le CD56, un marqueur de différenciation des myoblastes, Beckman Coulter). Le pourcentage de cellules positives devrait être d'au moins 80 %.

### **3.2.2 Culture cellulaire**

Le myoblastes humains sont cultivés dans un milieu MB-1 complet. Pour les détacher de la surface de culture, on rince d'abord avec de l'HBSS, puis on ajoute assez de trypsine 0,05 % (GIBCO) pour couvrir la surface cultivée (soit 2 mL par flacon de culture de 75 cm<sup>2</sup>). Lorsque les cellules sont congelées, on les resuspend dans 1 mL de milieu de congélation composé de 50 % de FBS, de 40 % de milieu MB-1 complet et de 10 % de DMSO (diméthylsulfoxyde, Sigma). Les cellules sont congelées entre 1 et 4 millions par vial. Les tubes sont mis sur glaces puis transférés à -80°C pour une nuit. Finalement, elles sont conservées à long terme dans l'azote liquide.

### **3.2.3 Pré-traitement à la thrombine**

Pour pré-traiter les cellules à la thrombine, onensemence d'abord des cellules dans une plaque de 24 puits. Le lendemain, lorsque les cellules sont adhérees, on les rince avec du HBSS puis on incube dans un milieu MB-1 sans sérum additionné de 0 à 200 nM d' $\alpha$ -thrombine humaine (Sigma). La plaque est ensuite incubée à 37°C pour une durée d'une heure. Après l'incubation, on retire le milieu avec thrombine, on rince au HBSS et on remet du milieu MB-1 complet pour la durée restante de l'expérience. Le jour du traitement est considéré comme le jour 0.

### **3.2.4 Évaluation du pourcentage de viabilité par cytométrie de flux**

La viabilité des cellules est évaluée par cytométrie de flux à l'aide d'un marquage au Hoescht – PI (propidium ioide). Le Hoescht marque l'ADN de toutes les cellules tandis que le PI, un agent intercalant, ne peut pénétrer que les cellules apoptotiques ou nécrotiques, c'est-à-dire qui ont perdu leur intégrité membranaire. Les cellules vivantes n'émettront donc que dans la longueur d'onde associée au Hoescht tandis que les cellules nécrotiques et apoptotiques émettront dans la longueur d'onde associée au PI en plus de celle émise par le Hoescht. Les cellules sont d'abord décollées de la surface de culture à l'aide de trypsine. L'action de la trypsine est arrêtée par l'ajout d'un volume équivalent de milieu de culture MB-1 complet. Les cellules sont lavées une fois dans le PBS et resuspendues dans 5  $\mu$ L de PI [20  $\mu$ g/mL] (Sigma). Les échantillons sont alors incubés à 4°C à l'obscurité pendant 30

minutes. On ajoute ensuite 71,25  $\mu\text{L}$  de solution saline physiologique (PBS) et 23,75  $\mu\text{L}$  d'éthanol 100 %. Les échantillons sont ensuite vortexés et incubés à 4°C pendant 5 minutes. On ajoute finalement 2,5 $\mu\text{L}$  de Hoescht 33 342 [122  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ] (Sigma).

### **3.2.5 Évaluation du taux de fusion par immunocytochimie**

Les cellules sontensemencées dans des plaques de 24 puits. Le milieu de culture est retiré pour être remplacé par un milieu sans FBS additionné de thrombine pour une période d'une heure. Suite à ce traitement, les cellules sont cultivées dans un milieu favorisant le processus de fusion pour une période de 48 heures (80-90 % de confluence). Ce milieu est un milieu de culture régulier MB-1 auquel n'est ajouté qu'un faible pourcentage de FBS (soit 2 %). En effet, la privation de sérum favorisera la fusion par rapport à la prolifération des myoblastes.

48 heures plus tard, les cellules sont fixées à l'éthanol 90 % pour 15 minutes. Les puits sont lavés 3 fois 5 minutes au PBS puis bloqués pendant 1 heure au PBS 10 % FBS. Le premier anticorps dirigé contre la chaîne lourde de la myosine (ou MHC, un marqueur de la différenciation des myoblastes en myotubes), produit chez la souris est appliqué en dilution 1 :100 dans du PBS 1 % FBS pour une heure. Suivent 3 lavages de 5 minutes au PBS. Puis le second anticorps couplé à l'Alexa 546 et dirigé contre les Ig de souris (Invitrogen) est déposé. Il est utilisé à 1 :300 dans du PBS 1 % FBS pour 1 heure. S'en suivent 3 lavages de 5 minutes au PBS dont le dernier contient 2,5  $\mu\text{M}$  de 4'-6-Diamidino-2-phenylindole (ou DAPI, marqueur de l'ADN, Sigma-Aldrich).

On observe le marquage avec un microscope à fluorescence. La MHC apparaît en rouge et les noyaux en bleu. On fait ensuite le décompte des noyaux totaux et le décompte de noyaux retrouvés dans les fibres positives pour la MHC. L'indice de fusion est le rapport, en pourcentage du nombre de noyaux retrouvés dans les fibres positives pour la MHC sur le nombre de noyaux totaux.

### **3.2.6 Évaluation de la prolifération par fluorescence**

La prolifération cellulaire est évaluée à l'aide du CyQUANT® (Molecular Probes). Le CyQUANT® est un colorant fluorescent vert qui se fixe à l'ADN cellulaire. L'ADN est

ensuite libéré par un tampon de lyse. Le kit est conçu pour détecter entre 50 000 et 250 000 cellules et le taux de fluorescence sera proportionnel à la quantité d'ADN, donc au nombre de cellules, contenu dans le puit.

Onensemence donc 50 000 cellules par puit d'une plaque 24 puits. Le lendemain, le milieu de culture est retiré pour être remplacé par un milieu sans FBS additionné de thrombine pour une période déterminée. La culture est ensuite poursuivie dans un milieu de culture régulier MB-1 complet. Après le traitement, on lave le tapis cellulaire à l'HBSS, puis on congèle un première plaque à  $-80^{\circ}\text{C}$  (Jour 0) et on en congèle une nouvelle toute les 24 heures jusqu'à 96 heures (Jour 4).

Au moment de la coloration au CyQUANT®, les plaques sont décongelées. On prépare une solution dans laquelle le colorant CyQUANT® est dilué 200X et le tampon de lyse est dilué 20X dans de l'eau apyrogène. On ajoute 200  $\mu\text{L}$  de cette solution à chaque échantillon et on incube 5 minutes à l'obscurité. La fluorescence est détectée à l'aide d'un lecteur de plaques à une excitation de 480 nm et une émission de 520 nm.

### **3.2.7 Évaluation de l'activité métabolique par colorimétrie**

L'activité cellulaire est évaluée grâce au MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tétrasodium bromide) (Chemicon, Millipore). Le MTT est un substrat jaune qui peut être clivé par la succinate déshydrogénase de la mitochondrie active pour former un précipité violet. Le MTT est conçu pour détecter l'activité de 1000 à 50 000 cellules. Onensemence 1000 cellules par puit d'une plaque 24 puits. Le lendemain, le milieu de culture est retiré pour être remplacé par un milieu sans FBS additionné de thrombine pour une période déterminée. La culture est ensuite poursuivie dans un milieu de culture régulier MB-1 complet. À partir du jour du traitement (Jour 0), on effectue le test toutes les 24 heures jusqu'à 96 heures (jour 4).

On ajoute 0,1 mL de MTT au milieu de culture, puis on incube à  $37^{\circ}\text{C}$  pour 4 heures. Le précipité produit est ensuite dissout à l'aide de 1 mL de solution de développement de la couleur (isopropanol avec 0,04 N de HCl). L'absorbance peut ensuite être lue par un lecteur de plaque à une longueur d'onde de 570 nm.

### 3.2.8 Greffe de myoblastes

Des cellules humaines en bas passage (entre passage 1 et 4) sont mises en culture environ deux jours avant la date de la greffe. Le jour même, on constate si les cellules ont une morphologie normale puis on les traite ou non avec de la thrombine 1 heure avant leur implantation à une concentration de 100 nM dans du milieu sans sérum et on les co-injecte ou non avec 100 nM de thrombine.

Pour cette expérience, on utilise des souris immunodéprimées SCID (*Severe Combined Immunodeficiency Disease*). Ces souris sont employées afin de contourner le phénomène de rejet. On implante les myoblastes avec de la cardiotoxine dans les *Tibialis anterior* de l'animal afin de créer des bris dans le muscle et ainsi favoriser l'intégration des cellules humaines qui sont implantées (voir la section 1.2.1 sur la régénération musculaire).

Une suspension cellulaire de 0,5 millions de cellules dans 10  $\mu$ L de cardiotoxine est injectée par microgreffes à plusieurs sites dans le *Tibialis anterior* de l'animal. Les cellules sont injectées à l'aide d'un piston et d'un capillaire (Drummond) préalablement effilé avec une source de chaleur et stérilisé à l'aide d'éthanol 70 %.

### 3.2.9 Évaluation du succès de greffe par immunohistochimie

Les animaux sont sacrifiés 21 jours après la greffe. Les muscles sont ensuite récupérés et laissés 24 heures à 4°C dans une solution de sucrose (Sigma) à 30 % afin de déshydrater le tissu. Le muscle est ensuite congelé dans l'azote liquide dans du Cryomatix (Thermo) puis coupé au cryostat en sections de 12  $\mu$ m.

On procède ensuite à une immunohistochimie dirigée contre la dystrophine humaine. Le marquage dirigé contre la dystrophine permet de voir combien de fibres musculaires se sont mises à l'exprimer suite à l'implantation des myoblastes. C'est le nombre de fibres musculaires positives pour la dystrophine qui détermine le succès de greffe. Le nombre de fibres positives pour la dystrophine est compté sur la coupe de muscle présentant le plus de marquage pour chacun des muscles.

Les coupes sont lavées une fois 5 minutes au PBS. On bloque ensuite au PBS 10 % FBS / 10 % sérum de chèvre / 2 % BSA (Fisher) pour 30 minutes. On applique l'anticorps dirigé

contre la dystrophine humaine (7F7) pour une heure en dilution 1 :50 dans du PBS 1 % FBS. On lave 3 fois 5 minutes au PBS. Un anticorps biotynylé dirigé contre les immunoglobulines de souris est laissé 30 minutes en dilution 1 :200 dans du PBS 1 % FBS. On lave 3 fois 5 minutes au PBS. Ensuite, un anticorps couplé à la streptavidine-Cy3 (Dako) est laissé 30 minutes en dilution 1 :500 dans du PBS 1 % FBS. On lave 3 fois 5 minutes au PBS et on rebloque au PBS 10 % FBS / 10 % sérum de chèvre / 2 % BSA pour 30 minutes. On incube avec la lamine A/C 1 heure en dilution 1 :100 dans du PBS 1 % FBS. On lave 3 fois 5 minutes au PBS. On incube finalement avec un anticorps anti-souris Alexa 488 (Invitrogen) en proportion 1 :300 dans du PBS 1 % FBS pour 1 heure. On lave 3 fois 5 minutes au PBS. Dans le dernier lavage, on ajoute du DAPI à 2,5  $\mu$ M. Pour conserver les lames, on ajoute une mince couche d'une solution de PBS et glycérol en proportions 1 :1 avant de les recouvrir d'une lamelle de verre.

## **3.2.10 Analyse statistique**

### **3.2.10.1 Test de Q**

Les valeurs obtenues lors des différentes expériences ont été gardées ou exclues selon le test statistique de Q.

### **3.2.10.2 Test ANOVA**

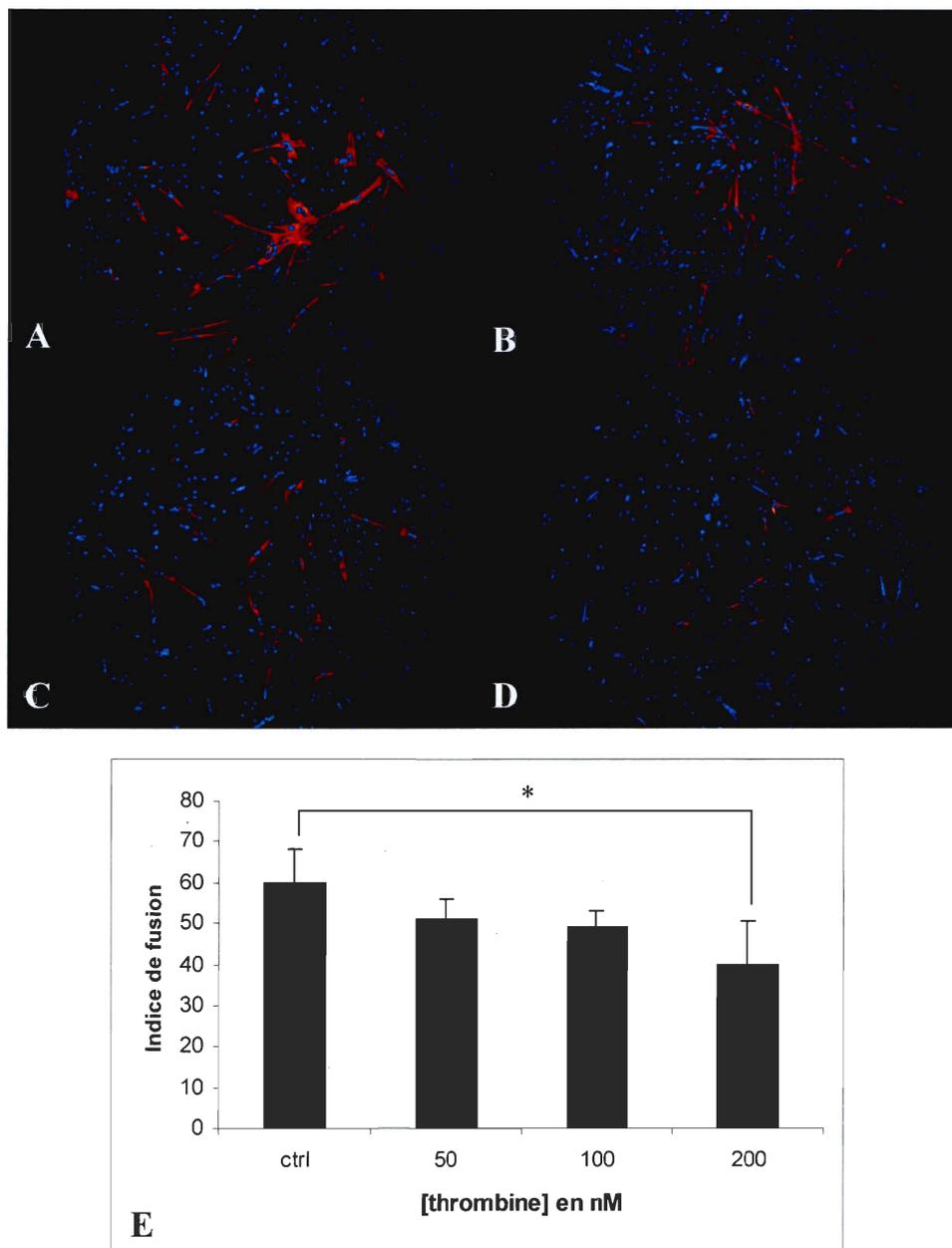
Le test ANOVA, analyse de la variance, a été utilisé pour déterminer si la différence entre deux résultats est significative. \* =  $p < 0,05$ .

### 3.3 Résultats

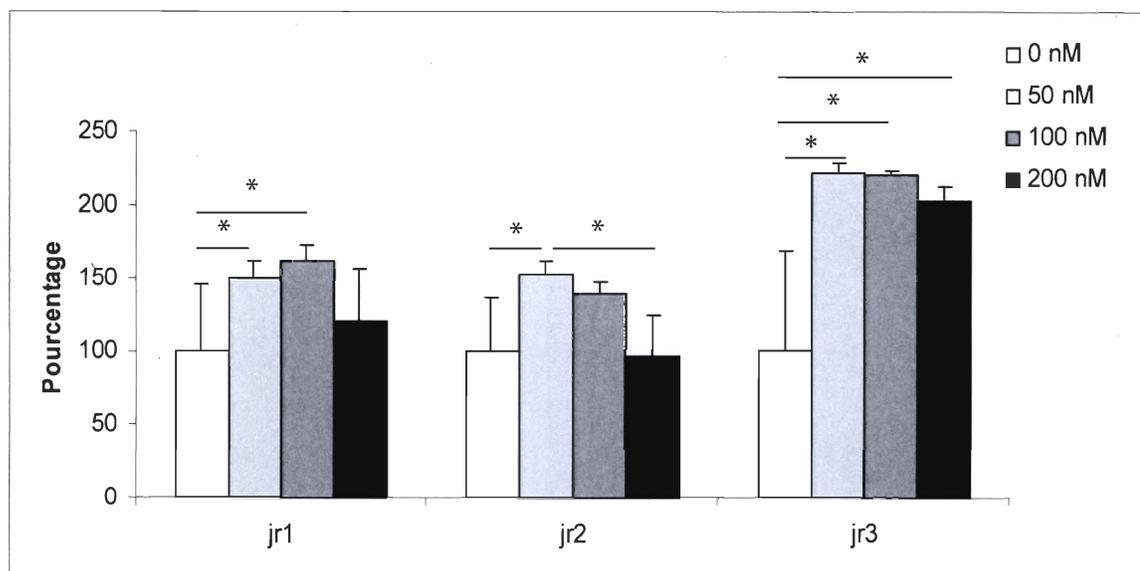
On a d'abord voulu vérifier si le pré-traitement à la thrombine retardait la fusion des myoblastes humains tel que décrit sur les myoblastes de souris dans l'article de de Niese et collaborateurs (de Niese, Chinni et al. 2002). Les cellules ont donc été pré-traitées une heure en milieu MB-1 non-additionné de sérum contenant 0 nM (ctrl), 50 nM, 100 nM ou 200 nM de thrombine. Suite à ce pré-traitement, la culture est poursuivie 48 heures en milieu de fusion soit un milieu MB-1 ne contenant que 2 % de FBS. Les cellules sont ensuite fixées et immunomarquées avec un anticorps dirigé contre la chaîne lourde de la myosine (MHC), un marqueur de la différenciation des myoblastes. Les noyaux sont marqués avec du DAPI. On observe ensuite les cellules au microscope à fluorescence et on compte le nombre de noyaux total ainsi que le nombre de noyaux se colocalisant avec la MHC. L'indice de fusion correspond au pourcentage de noyaux se colocalisant avec la MHC. En moyenne, les cellules pré-traitées avec 0 nM de thrombine ont un indice de fusion de 60 % avec 50 nM 51 %, avec 100 nM 49 % et avec 200 nM 40 % (Figure 12). On observe donc une diminution de l'indice de fusion avec l'augmentation de la concentration de thrombine dans le milieu de pré-traitement. Cette diminution est significative par rapport au contrôle à une concentration de 200 nM

En parallèle, on a voulu voir si le pré-traitement à la thrombine pouvait stimuler la prolifération des cellules. Les cellules ont été pré-traitées avec 0, 50, 100 ou 200 nM de thrombine durant une heure dans un milieu MB-1 sans FBS. Puis, à toutes les 24 heures, on arrête la croissance des cellules en les congelant à  $-80^{\circ}\text{C}$ . La fluorescence produite par le marquage de l'ADN à l'aide du kit CyQuant® est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre et est proportionnelle au nombre de cellules présentes dans l'échantillon. On a pu constater dès le lendemain du traitement (jr 1) que les puits pré-traités avec la thrombine à 50 nM ainsi que ceux traités avec 100 nM contiennent significativement plus d'ADN que les puits contrôles (Figure 13). Une augmentation significative de la quantité d'ADN pour ces concentrations est aussi observée aux jours 2 et 3. L'augmentation de la dose de thrombine dans le pré-traitement (soit à 100 nM ou 200 nM) n'a pas d'effet significativement plus

élevé par rapport au 50 nM (Figure 13). Au jour 3 (jr 3), les trois concentrations induisent une augmentation significative de la quantité d'ADN par rapport au contrôle (Figure 13).

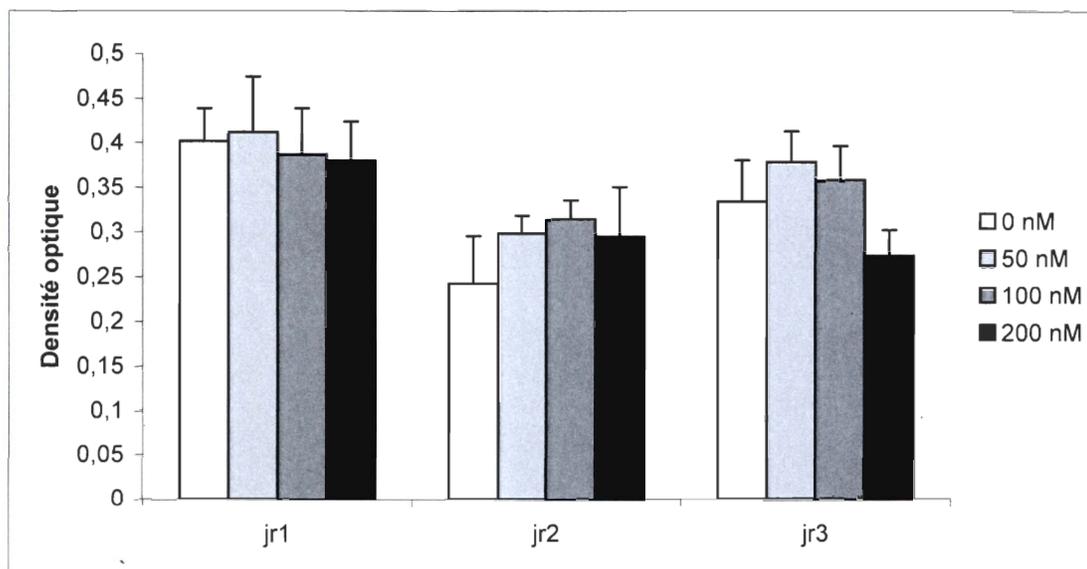


**Figure 12 : Indice de fusion des myoblastes exprimé en pourcentage de noyaux colocalisant avec la MHC.** Une immunocytochimie contre la MHC et un marquage des noyaux au DAPI est effectué suite à un pré-traitement avec 0 nM (A), 50 nM (B), 100 nM (C) ou 200 nM (D) de thrombine durant une heure, les cellules sont incubées 48 heures dans un milieu de fusion (MB-1 additionné de 2 % de sérum). Le nombre de noyaux moyen colocalisant avec la MHC est ensuite compilé (E). (n = 4 ; \* = p < 0,05).



**Figure 13 : Quantité d'ADN présent.** Les cellules sont pré-traitées durant une heure avec du milieu sans sérum contenant 0, 50, 100 ou 200 nM de thrombine. Le test a été effectué une fois par jour pendant trois jours. L'ADN cellulaire est estimé à l'aide du CyQuant. La quantité d'ADN est exprimée en pourcentage par rapport aux cellules n'ayant pas été exposées à la thrombine (  $n = 3$  ; \* =  $p < 0,05$ ).

On a voulu étudier l'effet d'un pré-traitement à la thrombine sur la stimulation de l'activité métabolique des cellules humaines. Les cellules sont d'abord pré-traitées avec 0, 50, 100 ou 200 nM de thrombine durant une heure dans un milieu MB-1 sans FBS. L'activité métabolique est mesurée chaque jour (jr 1 à jr 3) à l'aide du test MTT. Le réactif MTT est incubé pour une période de 4 heures. Suite à cette incubation, le précipité mauve créé par l'activité mitochondriale est solubilisé. On mesure ensuite la densité optique de l'échantillon à l'aide d'un spectrophotomètre. La densité optique mesurée est directement proportionnelle à l'activité mitochondriale de l'échantillon. Aucun pré-traitement n'a entraîné de variation significative du métabolisme sur une période de trois jours de culture (Figure 14).



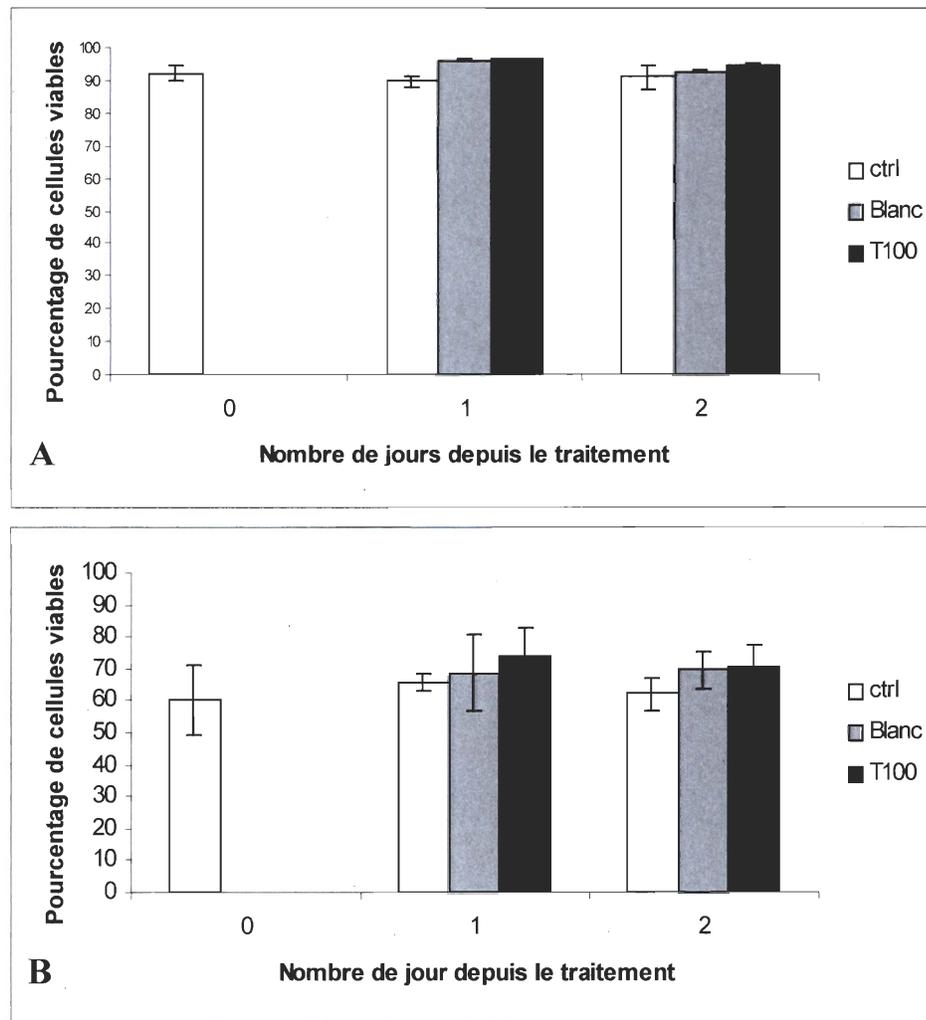
**Figure 14 : Activité métabolique des myoblastes.** Les cellules sont pré-traitées durant une heure avec du milieu sans sérum contenant 0, 50, 100 ou 200 nM de thrombine puis cultivées en milieu MB-1. Les cellules sont incubées durant 4 heures en présence de MTT le quel sera réduit en un composé mauve par l'activité mitochondriale des cellules. Ce composé est ensuite solubilisé. La densité optique est lue à 570 nM. (n = 4)

Suite à nos observations ainsi qu'à ce que décrit la littérature, nous avons décidé de choisir 100 nM comme concentration de thrombine pour les tests suivants. On a observé l'impact d'un pré-traitement à la thrombine sur la survie cellulaire. L'expérience a été effectuée soit en cultivant en milieu complet ou sans sérum. Les cellules soit n'ont pas été traitées (ctrl), soit ont été incubées dans un milieu sans sérum et sans thrombine (ou blanc) pour une durée d'une heure ou soit ont été pré-traitées avec 100 nM de thrombine (en milieu sans sérum) durant une heure. Suite à l'heure de pré-traitement, le milieu a été remplacé soit par du milieu MB-1 complet (Figure 15 A) soit par du milieu MB-1 sans sérum (Figure 15 B). Les cellules ont ensuite été marquées au Hoescht - P.I. pour les analyser en cytométrie de flux. Comme contrôle, on a évalué des cellules au jour 0 (ou jour du traitement) puis on a repris des mesures 24 heures et 48 heures après le traitement (soit respectivement les jours 1 et 2). En milieu avec sérum (Figure 15 A), les cellules contrôles, les cellules pré-traitées avec 0 nM de thrombine et les cellules pré-traitées avec 100 nM de thrombine présentent le même taux de viabilité soit entre 90 % et 95 %. Les différences sont non-significatives.

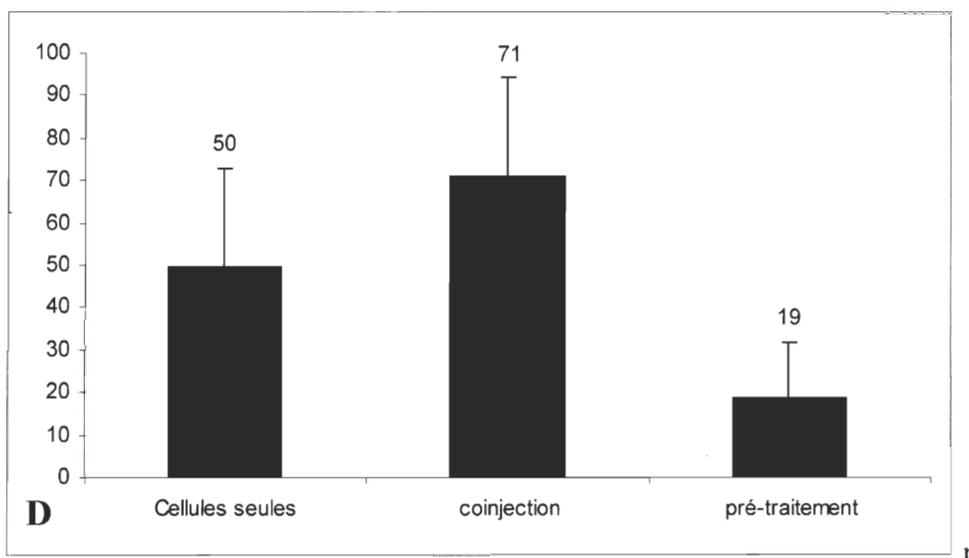
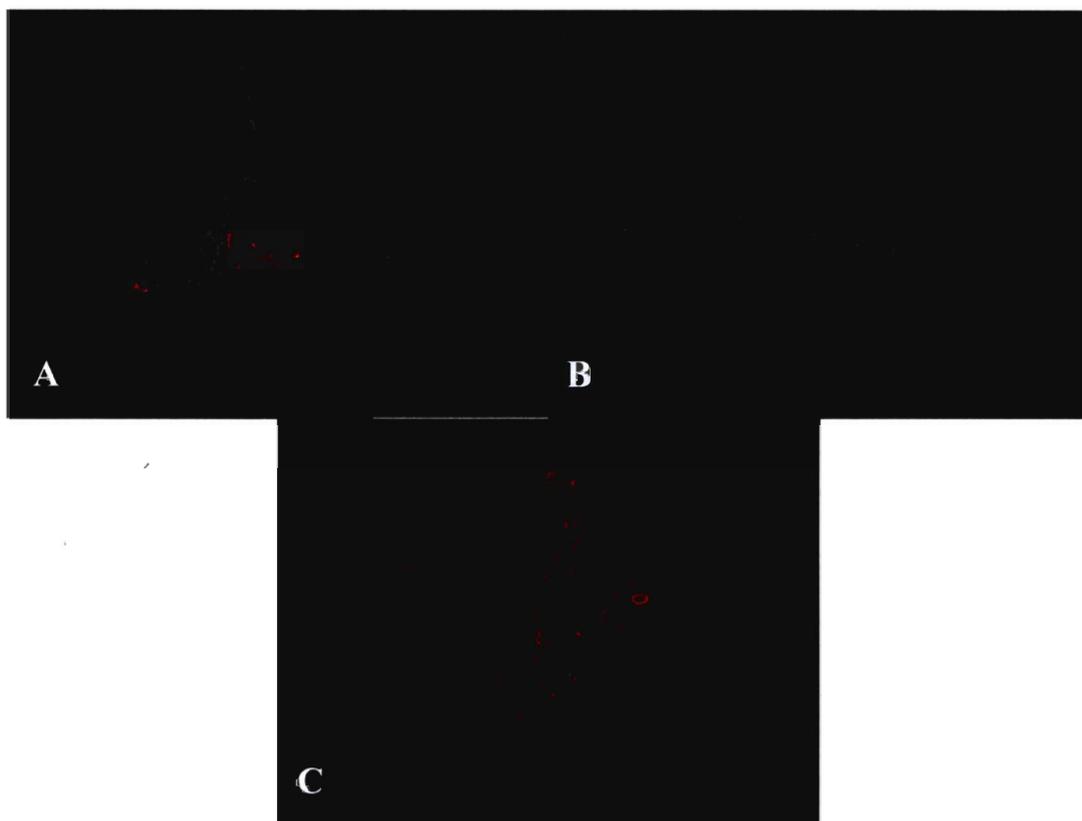
Pour le milieu sans sérum (Figure 15 B), les différences ne sont pas non plus significatives et le taux de survie des cellules se situe entre 60 % et 74 % dans tous les cas.

Finalement, un test préliminaire *in vivo* a été effectué afin de déterminer si le pré-traitement et/ou la co-injection de thrombine peuvent avoir une influence positive sur le succès de greffe. Le pré-traitement permet de reproduire ce qui a été testé *in vitro* alors que la co-injection permet de vérifier si on peut directement activer les PARs au moment de la greffe et ainsi contourner l'étape de pré-traitement. Chaque condition a été effectuée sur trois muscles. Les myoblastes sont pré-traités durant une heure avec 100 nM de thrombine dans un milieu MB-1 sans FBS (condition pré-traitement) ou cultivés de manière régulière (conditions cellules seules et co-injection). On injecte 10  $\mu$ L d'une suspension de 0,5 million de cellules dans la cardiotoxine seule (conditions cellules seules et pré-traitement) ou dans la cardiotoxine additionnée de 100 nM de thrombine (condition co-injection). Les 10  $\mu$ L de suspension cellulaire sont implantés par micro-injections intra-musculaires dans le *Tibialis anterior* de souris immunodéprimées SCID. Après 21 jours, les souris sont sacrifiées et les *Tibialis anterior* sont récoltés et congelés dans du Cryomatrix. Les muscles sont ensuite coupés au cryostat et on procède à une immunohistochimie dirigée contre la dystrophine humaine. Le nombre de fibres positives pour la dystrophine humaine représente le succès de greffe.

La co-injection semble exercer un effet positif sur le succès de la greffe, mais le résultat n'est pas significatif. Le pré-traitement des cellules a eu un effet négatif sur le succès de la greffe. En effet, nous retrouvons une moyenne de 50 fibres positives pour la dystrophine dans le contrôle cellules seules tandis qu'il y a en moyenne 71 fibres positives pour la dystrophine dans les muscles où les cellules ont été co-injectées avec de la thrombine et 19 dans les muscles greffés avec des cellules pré-traitées avec 100 nM de thrombine une heure avant la chirurgie (Figure 16).



**Figure 15 : Pourcentage de cellules viables** évalué en cytométrie de flux à l'aide d'un marquage au Hoescht – P.I. selon que les cellules n'ont pas subi de pré-traitement (ctrl), un pré-traitement blanc (sans thrombine et sans sérum) durant une heure ou un pré-traitement de 100 nM de thrombine (sans sérum) durant une heure puis cultivées durant 48 heures avec sérum (**A**) ou sans sérum (**B**). (n = 4)



**Figure 16 : Succès de greffe.** Après 21 jours suite à la greffe de myoblastes, les *Tibialis anterior* des souris sont récoltés, congelés et coupés au cryostat. On procède à une immunohistochimie dirigée contre la dystrophine humaine pour la greffe effectuée avec les cellules seules (**A**), avec une coinjection de thrombine 100 nM (**B**) ou avec des cellules pré-traitées avec 100 nM de thrombine (**C**). Le succès de la greffe se traduit par le nombre moyen de fibres exprimant la dystrophine dans une coupe transversale de muscle pour chaque condition (**D**). (n = 4)

### 3.4 Discussion

Le but de cette étude était de déterminer si un pré-traitement avec de la thrombine pouvait contribuer à l'amélioration du succès de greffe de myoblastes chez le modèle murin de la DMD en favorisant la prolifération cellulaire.

On a d'abord évalué l'effet d'un pré-traitement à la thrombine de 50 nM, 100 nM ou 200 nM sur le taux de fusion des cellules. On a pu observer une baisse significative du taux de fusion d'environ 20 % par rapport au contrôle suite à un pré-traitement à la thrombine uniquement pour la dose de 200 nM. Chinni et collaborateurs en 1999 ont aussi obtenu une baisse significative de la fusion des myoblastes de souris d'environ 20 % pour cette concentration. Pour 50 nM et 100 nM, aucune diminution significative n'est observée, alors que le groupe de Chinni et collaborateur a obtenu une diminution aussi importante à 100 nM qu'à 200 nM (soit environ 20 %). Cependant, nos expériences ont été effectuées avec des myoblastes humains alors que les expériences effectuées par ce groupe en 1999 ont été effectuées sur des myoblastes de rat (Chinni, de Niese et al. 1999). De plus, alors que notre groupe détermine l'indice de fusion comme étant le nombre de noyaux se colocalisant avec la MHC (marqueur des myotubes), l'équipe de Chinni et collaborateurs a déterminé l'indice de fusion par rapport au nombre de noyaux se colocalisant avec la desmine (marqueur des myoblastes). Ils ont déterminé la présence de myotubes selon la morphologie des cellules positives pour la desmine. Ce qui me semble moins rigoureux que notre méthode qui se base sur la présence d'un marqueur de différenciation (des myotubes) (Chinni, de Niese et al. 1999). Cependant, les résultats obtenus par leur équipe et ceux obtenus par la nôtre semblent pouvoir confirmer qu'un retard de la fusion peut être induit par un pré-traitement à la thrombine.

Suite à cela, on a évalué l'effet d'un pré-traitement à la thrombine sur la prolifération des myoblastes. Nous avons obtenu une augmentation significative de la quantité d'ADN présent dans les puits pré-traités une heure avec 50 nM et 100 nM aux jours 1, 2 et 3. Trois jours après le traitement, il y avait aussi une hausse significative dans le puit pré-traité avec 200 nM. Suidan et collaborateurs ont démontré en 1999 une hausse significative de la prolifération des myoblastes de rat avec un pré-traitement de 24 heures avec 10 nM de

thrombine (Suidan, Niclou et al. 1996). La concentration en thrombine utilisée par ce groupe est plus faible que les nôtres, mais le temps d'exposition est aussi plus long ce qui à pour désavantage de priver les cellules de sérum pour une plus longue période de temps. Il semble donc qu'un temps d'exposition moins long peut être compensé par une hausse de la concentration en thrombine dans le milieu de pré-traitement.

Les résultats du test de fusion peuvent être comparés à ceux du jour 2 du test de prolifération (ces deux résultats correspondant tous deux à 48 heures après le pré-traitement). On peut alors constater que, pour une concentration de 200 nM, on obtient la même quantité d'ADN que dans les puits contrôles malgré un taux de fusion moins élevé. Ceci confirme que la différence entre les taux de fusion du contrôle et des cellules pré-traitées est bien dû à l'action de la thrombine et non à une augmentation de la prolifération. En effet, les cellules peuvent soit proliférer, soit fusionner, donc plus la confluence cellulaire est élevée, plus les cellules ont tendance à fusionner entre elles.

On a ensuite voulu voir si le pré-traitement avec de la thrombine pouvait faire varier l'activité métabolique des myoblastes. La représentation graphique des résultats ne révèle pas de variation significative dans l'activité métabolique des myoblastes ni en fonction de la concentration de thrombine utilisée ni au cours du temps. La thrombine ne semble donc pas intervenir dans le métabolisme cellulaire.

Suite à ces résultats, on a étudié l'impact d'un pré-traitement à la thrombine sur la survie cellulaire. Suite aux résultats obtenus précédemment et aux résultats obtenus en 1999 et 2002 par Chinni et de Niese, seule la concentration de 100 nM a été testée (Chinni, de Niese et al. 1999; de Niese, Chinni et al. 2002). Dans un premier temps, le test a été effectué en cultivant les cellules en milieu régulier, c'est-à-dire avec sérum, suite au pré-traitement. Ce test n'a pas révélé d'amélioration due à la thrombine. Par contre, le taux de survie du contrôle étant de près de 100 %, il n'était donc pas possible de voir si la thrombine pouvait améliorer la survie cellulaire. Le test a ensuite été refait, mais en poursuivant la culture cellulaire en milieu sans sérum afin d'imposer un stress aux cellules. Contrairement à ce qui avait été obtenu par Chinni et de Niese en 1999 sur des cellules de rat, on a pas observé de protection sur les cellules humaines contre le stress causé par la privation de sérum. Il semble donc que le nombre plus élevé de myoblastes observés suite à

un pré-traitement à la thrombine soit bien causé par une prolifération accrue et non par une meilleure survie des cellules.

L'expérience a révélé une hausse non-significative du nombre de fibres positives pour la dystrophine pour les cellules co-injectées avec 100 nM de thrombine par rapport au contrôle de cellules non-traitées. Par contre, les cellules pré-traitées avec 100 nM de thrombine présente un succès de greffe moins élevé que celui du contrôle (non-significatif) et significativement moins élevé que celui obtenu lors de la co-injection. Étant donné que la thrombine n'a pas d'effet sur la survie des myoblastes, ceci explique qu'un prétraitement ne contribue pas à améliorer le succès de la greffe. Par contre, comme la présence de thrombine favorise la prolifération, ceci peut expliquer que lors de la coinjection elle stimule les cellules implantées augmentant ainsi le succès de greffe.

Il est aussi important de souligner qu'au moment de cette greffe, le protocole recommandait l'injection simultanée de cardiotoxine avec les myoblastes. Depuis, le protocole a été modifié ; la cardiotoxine est injectée dans le *Tibialis anterior* de l'animal la veille de la greffe, afin d'éviter toute interférence lors de la greffe de myoblastes. Il est donc possible que le résultat observé ne soit pas optimal. De plus, il est possible que la thrombine ait pu réagir avec la cardiotoxine et être inactivée.

### 3.5 Conclusion et perspectives

On a pu démontrer qu'un pré-traitement avec de la thrombine diminue le taux de différenciation des myoblastes et myotubes, mais augmente la prolifération cellulaire *in vitro*. Par contre, la survie cellulaire ne semble pas influencée par la présence de thrombine. Malgré les résultats *in vitro* encourageants, un pré-traitement avec de la thrombine des myoblastes n'a pas augmenté le succès de la greffe.

Afin de confirmer les résultats obtenus *in vitro*, on va tenter d'utiliser une gamme plus large de temps d'exposition ainsi que de concentrations de thrombine lors de pré-traitements. Selon les résultats qui seront obtenus *in vitro*, l'expérience *in vivo* devra être reprise avec ces temps d'exposition et ces concentrations. De plus, une autre condition combinant le pré-traitement et la co-injection de thrombine lors de la greffe sera ajoutée.

La présence du récepteur activé par les protéases PAR-1 pourrait être analysée par RT-PCR afin de suivre l'évolution de l'expression de ce récepteur selon le temps de culture des myoblastes. Ceci permettra de déterminer si le moment choisi pour le pré-traitement est idéal ou si l'effet observé est faible dû à une faible présence du récepteur.

De plus, il semble que la distribution des récepteurs PARs ne soit pas la même selon les tissus ni selon les espèces. Les concentrations et protocoles dont nous nous sommes inspirés proviennent de résultats d'expériences sur des cellules musculaires animales (Chinni, de Niese et al. 1999; Coughlin 2000; Chevessier, Hantai et al. 2001; de Niese, Chinni et al. 2002). Ceci pourrait expliquer les différences observées entre nos résultats et ceux retrouvés dans la littérature.

Suite à cela, il serait intéressant d'étudier l'effet d'autres protéases sur la fusion, la prolifération et la survie des myoblastes. Entre autres, il serait intéressant d'effectuer ces tests de survie avec 200 nM de thrombine afin de déterminer si la diminution de la prolifération observée aux jours 1 et 2 serait due à une hausse de la mort cellulaire causée par une trop forte concentration de thrombine.

Bien que la thrombine ait un effet sur les myoblastes humains, les paramètres ne sont pas encore optimaux pour l'utiliser afin d'augmenter significativement le succès de la greffe de myoblastes. De plus, il a été récemment démontré que la thrombine est impliquée dans la diminution de l'adipogenèse ce qui pourrait permettre de diminuer l'infiltration graisseuse chez le patient atteint de DMD (Hosoyama, Ishiguro et al. 2009).

Aussi, les mécanismes et voies de signalisation par lesquels la thrombine agit sur les myoblastes squelettiques ne sont pas encore bien définis, mais pourraient impliquer la nestine (Huang, Shi et al. 2009) et l'ostéopontine (Uaesoontrachoon, Yoo et al. 2008) qui sont deux molécules favorisant la prolifération des myoblastes. Il serait donc intéressant d'étudier le niveau d'expression de ces molécules dans le muscle dystrophique chez le patient atteint de DMD avant et après stimulation avec la thrombine.

**- LA FIBRINE -**

# LA FIBRINE

## 4.1 Introduction

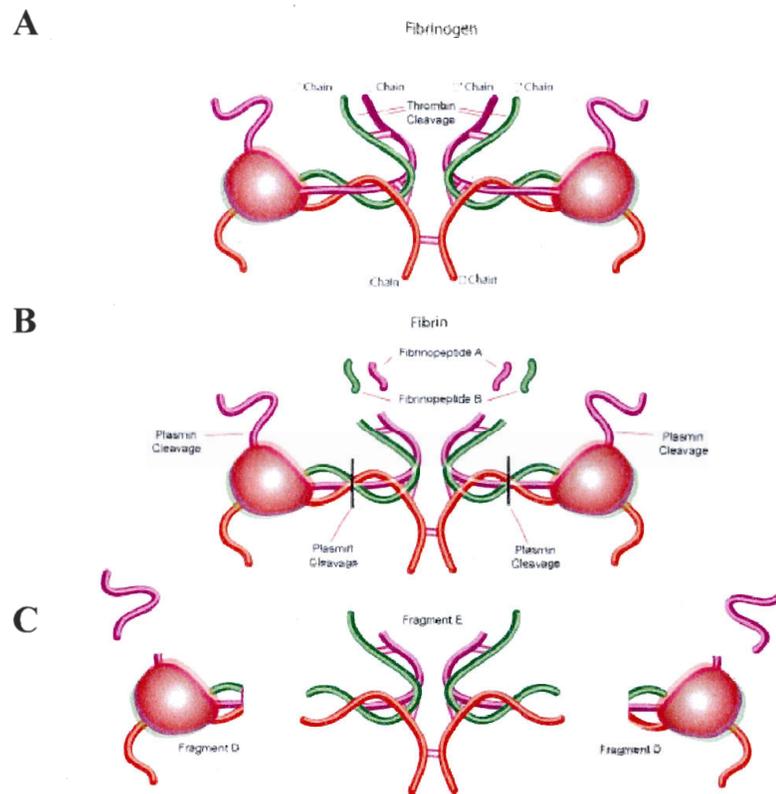
Le caillot de fibrine est la finalité de la cascade de la coagulation. La cascade de la coagulation est initiée par un bris au niveau du vaisseau sanguin. La fibrine est un dérivé du fibrinogène qui est une molécule de 340 kDa produite par le foie et présente à une concentration de 2-4 mg/mL dans le plasma sanguin (Weisel 2005; Wolberg and Campbell 2008).

### 4.1.1 Rôle de la fibrine

Le rôle principal de la fibrine *in vivo* est de contribuer à l'homéostasie en se joignant aux plaquettes sanguines pour colmater le vaisseau sanguin abîmé afin d'arrêter le saignement.

### 4.1.2 La formation de la fibrine.

La fibrine est créée par l'action protéolytique de la thrombine sur le fibrinogène (voir section 3.1.1 sur les rôles de la thrombine). Le fibrinogène est composé de deux agencements de trois chaînes polypeptidiques, la chaîne A $\alpha$ , la B $\beta$  et la  $\gamma$ , liées par des ponts disulfures (Figure 17 A). L'action de la thrombine clive successivement les fibrinopeptides A et B pour former des monomères de fibrine (Figure 17 B) qui s'organiseront en multimères avec l'aide du FXIII<sub>a</sub> (l'activation du FXIII est aussi assumée par la thrombine en présence de Ca<sup>2+</sup>) (Di Cera, Dang et al. 1997). Plus spécifiquement, le clivage du fibrinopeptide A correspond à l'association des parties terminales des molécules de fibrine tandis que le clivage du fibrinopeptide B l'est avec l'association latérale (Radosevich, Goubran et al. 1997). Le multimère de fibrine consiste en ce qu'on appelle le caillot physiologique (Di Cera, Dang et al. 1997).



**Figure 17 : Structures moléculaires du fibrinogène et de la fibrine.** La molécule de fibrinogène est composée de deux agencements de trois chaînes polypeptidiques, la chaîne  $A\alpha$ , la  $B\beta$  et la  $\gamma$ , liées par des ponts disulfures (A). L'activité protéolytique de la thrombine clive la molécule de fibrinogène pour libérer les fibrinopeptides A et B et créer la fibrine (B). L'action protéolytique de la plasmine dégrade la fibrine en produits de dégradation, ou fragments D et fragment E (C) (Sigma-Aldrich 2009).

#### 4.1.3 Le gel de fibrine

Le gel de fibrine est l'équivalent du caillot physiologique produit *in vitro*. Lors de sa production, on mime la cascade de la coagulation à partir de l'étape où la thrombine clive le fibrinogène (Section 4.2.3). Les avantages du gel sont nombreux, notamment il peut être dégradé de manière naturelle par l'organisme, ne favorise pas l'inflammation, n'entraîne pas de rejet, de nécrose ou de fibrose (Breen, O'Brien et al. 2009). Le gel de fibrine est déjà utilisé en clinique à de multiples fins et est disponible sous forme d'ensemble à reconstituer. On l'utilise, par exemple, pour combler un vide laissé par l'excision d'une tumeur, sceller un pneumothorax, contrôler des saignements ou encore aider à la cicatrisation (Radosevich, Goubran et al. 1997). *In vitro*, il a été décrit qu'il est possible de

cultiver des myoblastes en gel de fibrine et que ceux-ci s'y différencient, y migrent, y prolifèrent et dégradent le gel (Huang, Dennis et al. 2005; Levenberg, Rouwkema et al. 2005; Laurens, Koolwijk et al. 2006; Breen, O'Brien et al. 2009). De plus, le gel de fibrine a la capacité de lier des facteurs de croissance (GF), comme le facteur de croissance des fibroblastes-2 (FGF-2) ou le facteur de croissance des cellules endothéliales vasculaires (VEGF) qui, ajoutés au gel, stimulent l'angiogenèse. On peut aussi ajouter des facteurs, des drogues ou même des vecteurs viraux, au gel dans le but de les libérer de manière constante sur la période correspondant à leur temps de dégradation (Huang, Dennis et al. 2005; Jeon, Ryu et al. 2005; Laurens, Koolwijk et al. 2006; Bhang, Jeon et al. 2007; Breen, O'Brien et al. 2009). Le gel de fibrine permet aussi de stimuler l'angiogenèse (Radosевич, Goubran et al. 1997; Levenberg, Rouwkema et al. 2005). Enfin, il est possible d'injecter une suspension de myoblastes en fibrine *in vivo* afin de recréer du tissu musculaire (Beier, Stern-Straeter et al. 2006).

Il est possible de modifier les propriétés du gel de fibrine selon les besoins. Par exemple, en modifiant le pH de neutre à basique, on peut modifier le temps de coagulation, la taille des fibres et l'opacité du gel. La concentration en fibrinogène, en thrombine, en  $\text{Ca}^{2+}$  ou en FXIII peut aussi altérer ces paramètres. (Laurens, Koolwijk et al. 2006)

#### **4.1.4 La dégradation de la fibrine**

La formation du caillot favorisera l'activation du plasminogène en plasmine. Le rôle de la plasmine est de dégrader la fibrine, par protéolyse, en produits de dégradation du fibrinogène (soit les fragments D et E) (Figure 17 C). La dégradation de la fibrine peut être retardée par la présence d'aprotinine qui se fixe au site actif d'enzymes de manière réversible empêchant ainsi leur action. *In vivo*, le FXIII<sub>a</sub> a aussi un rôle à jouer dans le retardement de la dégradation du caillot en stimulant l'activation d'inhibiteurs de la plasmine et de l'activation du plasminogène (Radosевич, Goubran et al. 1997).

La fibrine constitue donc un biomatériau de choix puisqu'elle est dégradée progressivement par l'organisme de manière naturelle fournissant aux cellules un matériau d'attachement en attendant que celles-ci se mettent à produire leur propre ECM. De plus, comme le gel est

créé à partir de solutions liquides, il est possible d'y resuspendre les cellules ainsi que de l'injecter évitant ainsi une l'obligation d'ouvrir le muscle pour implanter le matériau. Sa méthode de production permet aussi de faire varier ses propriétés, telles la solidité, le temps de réticulation ou le temps de dégradation selon les besoins. Il sera aussi possible d'y resuspendre d'autres molécules. Par exemple des GF, avec ou sans myoblastes, qui seront libérés progressivement au long de la période de dégradation.

## **4.2 Matériel et méthodes**

### **4.2.1 Obtention de cellules à partir d'une biopsie**

Voir la section 3.2.1.

### **4.2.2 Culture de cellules humaines**

Voir la section 3.2.2.

### **4.2.3 Formation de gels de fibrine *in vitro***

Afin de former des gels de fibrine *in vitro*, on resuspend d'abord les cellules dans du fibrinogène [3 mg/mL] à raison de 200 000 cellules/mL. On dépose 500 µL de la suspension dans un puit d'une plaque de 24 puits. On y ajoute 15 µL de chlorure de calcium (CaCl<sub>2</sub>) [150 mM]. Finalement, ajoute 15 µL de thrombine [50 U/mL] et on homogénise le tout. Finalement, on laisse polymériser 10 minutes à 37°C. Les gels sont cultivés dans du milieu MB-1 complet auquel on ajoute 50 U/mL d'aprotinine pour ralentir la dégradation du gel par les cellules.

### **4.2.4 Évaluation de l'activité métabolique par absorbance**

L'activité cellulaire est évaluée grâce au XTT (2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide inner salt, Sigma). Le principe est semblable à celui du MTT (section 3.1.7) à la différence que le composé coloré est soluble et directement libéré par les cellules. On ensemence d'abord des gels de fibrine tel que décrit à la section 4.2.3. Les cellules sont ensuite cultivées en présence de milieu MB-1 complet additionné de 50 U/mL d'aprotinine. On rince deux fois les puits à l'HBSS puis on dépose 200 µL d'une solution contenant du XTT [1 mg/mL] et du PMS (Phenazine methosulfate, Sigma) [1,5 mg/mL] par puit. Le tout est incubé durant 3 heures. L'absorbance est ensuite mesurée à 450 nm avec un spectrophotomètre.

#### 4.2.5 Greffe de myoblastes

Des cellules humaines en bas passage (entre passage 1 et 4) sont mises en culture environ deux jours avant la date de la greffe. Le jour de la greffe, on détache les cellules puis on les aliquote à une densité de 500 000 cellules par eppendorf. On implante 0,5 millions de cellules dans les *Tibialis anterior* de souris RAG-mdx. Les souris RAG-mdx sont à la fois immunodéprimées et déficientes en dystrophine.

Une suspension cellulaire de 0,5 millions de cellules est implantée en suspension avec 10  $\mu$ L de fibrinogène [4 mg/mL] dilué dans du HBSS additionné de  $\text{CaCl}_2$  [9 mM] et de 5  $\mu$ L de thrombine [3 U/mL]. Les cellules sont implantées soit en ouvrant le muscle de la souris à l'aide d'un scalpel pour y déposer la suspension cellulaire, soit en microinjectant la suspension cellulaire tel que décrit à la section 3.2.7.

#### 4.2.6 Évaluation du succès de greffe par immunohistochimie

Voir la section 3.2.8.

#### 4.2.7 Évaluation de la mortalité *in vivo*

La mortalité cellulaire est évaluée *in vivo* grâce au  $^{14}\text{C}$ . Les myoblastes humains en culture, vers 50 % de confluence, sont mises en présence de 0,25  $\mu\text{Ci/mL}$  de milieu de thymidine radiomarquée avec du  $^{14}\text{C}$  durant les 48 heures précédant la greffe. Pendant ces 48 heures, le  $^{14}\text{C}$  s'incorporera à l'ADN des cellules en division rendant celui-ci radioactif. La radioactivité totale du muscle sera proportionnelle au nombre de cellules implantées toujours viables. Les cellules sont implantées par microinjection dans le *Tibialis anterior* d'une souris immunodéprimée RAG.

Des muscles sont récupérés au jour de la greffe et 5 jours après la greffe, puis mis dans des eppendorfs et plongés dans l'azote. On ajoute 500  $\mu$ L de tampon de lyse à chaque échantillon (pour 1 L : 3,64 g de Tris Base pH 8,0, 10 g de SDS, 20 mL d'EDTA 0,5 M) et on émince le muscle. On ajoute 50  $\mu$ L de protéinase K [10 mg/mL]. Puis, les tubes sont incubés dans un bain-marie à 55°C jusqu'à l'obtention d'une solution limpide.

On ajoute 500  $\mu\text{L}$  d'une solution de phénol – chloroforme – alcool isoamyl en proportions 25 :24 :1 (Sigma) dans chaque échantillon. On agite les tubes, puis centrifuge 3 minutes à 15 000 rpm (ou 16 000 g). La phase du dessus est récupérée dans un autre tube et on ajoute 500  $\mu\text{L}$  de chloroforme. On agite les tubes puis on les centrifuge 3 minutes à 15 000 rpm. On récupère la phase du dessus à laquelle on ajoute 25  $\mu\text{L}$  d'acétate de sodium 3 M et 1 mL d'alcool 100 % froid et on centrifuge 8 minutes à 15 000 rpm. Le surnageant est aspiré et on ajoute 500  $\mu\text{L}$  d'éthanol 70 % au culot, on centrifuge 8 minutes à 15 000 rpm et on sèche le culot qui contient l'ADN cellulaire.

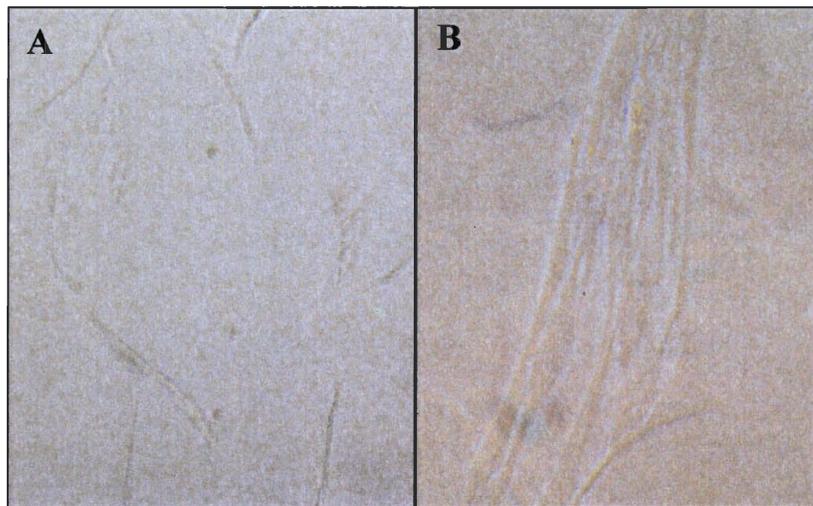
Le culot est resuspendu dans 100  $\mu\text{L}$  d'eau stérile. 2  $\mu\text{L}$  sont réservés pour le dosage de l'ADN. On ajoute 1 mL de liquide à scintillation dans le tube eppendorf qu'on transfère dans un tube pour la radioactivité contenant déjà 4 mL de liquide à scintillation. La radioactivité est comptée en désintégration par minutes (dpm).

#### **4.2.8 Analyse statistique**

Voir la section 3.2.8

### 4.3 Résultats

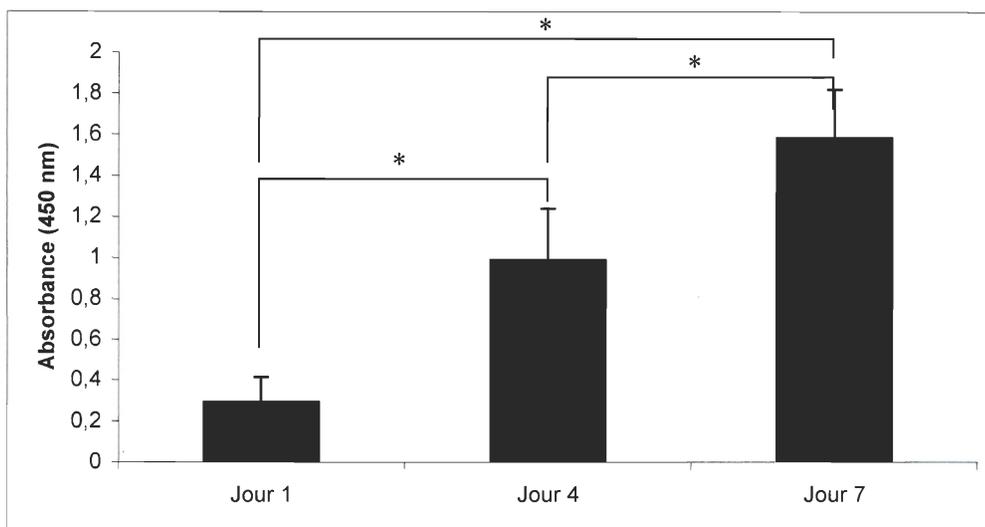
Pour les études *in vitro*, les cellules ont étéensemencées et cultivées en gel de fibrine. On resuspend 100 000 cellules dans du fibrinogène auquel on ajoute ensuite de la thrombine et du  $\text{CaCl}_2$ . Les gels sont laissés à polymériser pendant 10 minutes puis les cellules sont cultivées durant une semaine dans un milieu contenant de l'aprotinine. Dans un premier temps, on a observé la morphologie des cellules. Après 4 jours en culture, on remarque que les myoblastes sont allongés (Figure 18 A). Après 7 jours, les cellules ont commencé à s'aligner et, certaines, à se fusionner (Figure 18 B).



**Figure 18 : Morphologie des myoblastes cultivés en gel de fibrine.** Les cellules sont cultivées pendant une semaine dans du milieu MB-1 complet additionné d'aprotinine. La morphologie des cellules est observée au jour 4 suivant l'ensemencement (A) et après une semaine de culture (Jour 7) (B).

L'activité métabolique a également été étudiée afin de vérifier si les cellules sont actives lorsqu'elles sont ensemencées en gel de fibrine. On effectue le test du XTT 1 jour, 4 jours et 7 jours suite à l'ensemencement. On ajoute 200  $\mu\text{L}$  de solution XTT contenant du PMS qu'on laisse incuber 3 heures à  $37^\circ\text{C}$  puis on mesure l'absorbance à 450 nm. L'activité métabolique est proportionnelle à l'absorbance. L'absorbance au jour 4 est 2,4 fois plus

élevée par rapport au jour 1 et celle au jour 7 est 4,5 fois plus élevée par rapport au jour 1 (et de 2,1 fois par rapport au jour 4) (Figure 19).



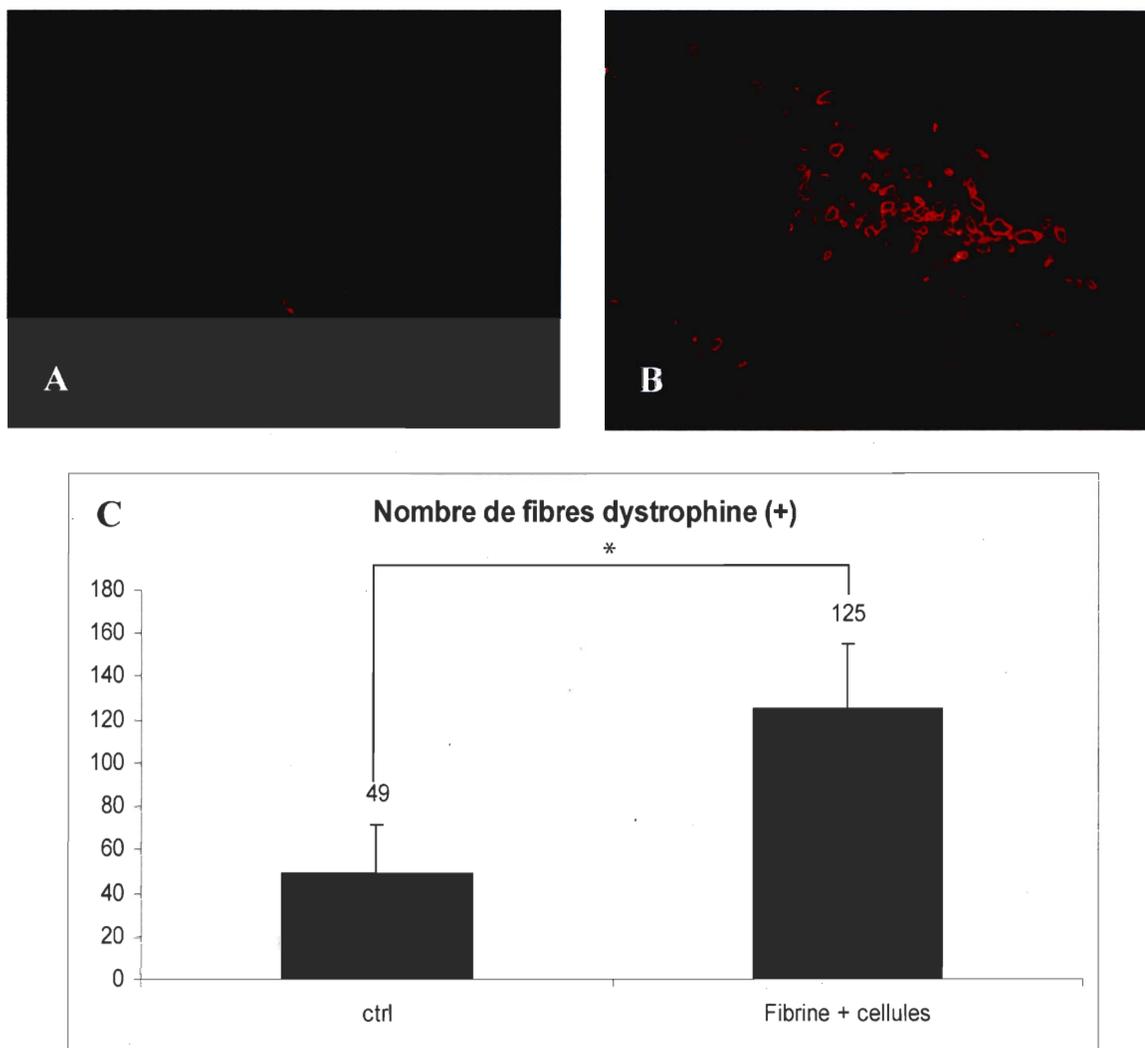
**Figure 19 : Activité métabolique des myoblastes.** Les cellules sont ensemencées en gel de fibrine puis cultivées dans un milieu MB-1 complet contenant de l'aprotinine. Les cellules sont incubées durant 3 heures en présence de XTT. (n = 8 ; \* = p < 0,05)

Le processus de dégradation du gel de fibrine a été suivi sur une période de 10 jours. Après 4 jours, la structure du gel est altérée et il commence à se détacher de la paroi du puit de culture. Après 7 jours, le gel est complètement détaché de la paroi et son volume a diminué de manière importante. Enfin, après 10 jours de culture, les myoblastes ont totalement résorbé le gel de fibrine.

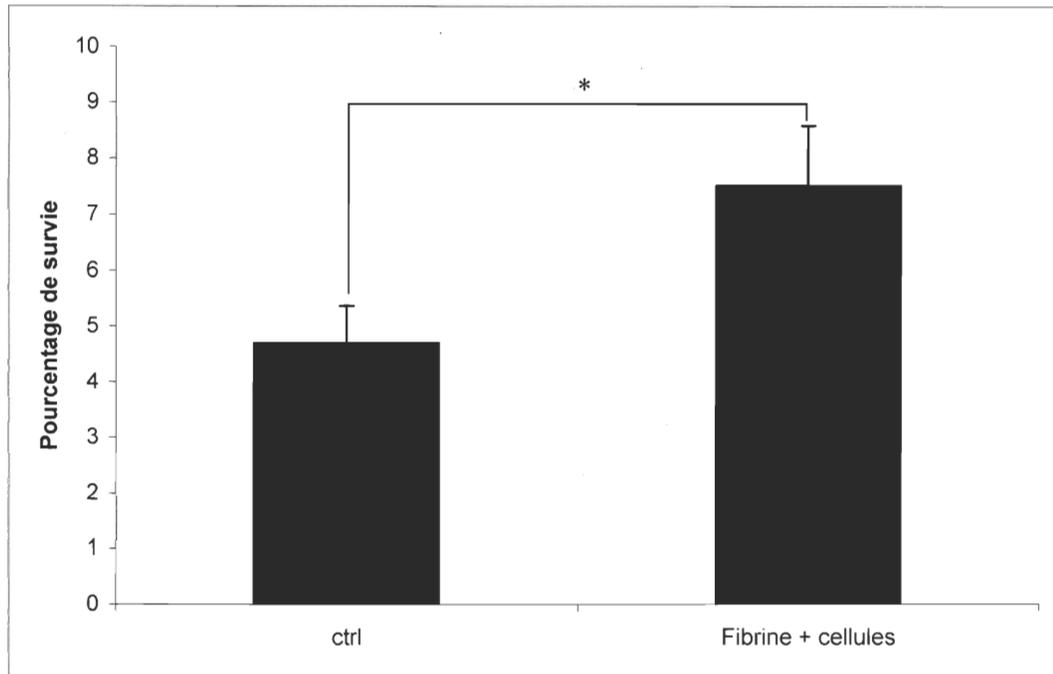
*In vivo*, on a d'abord voulu voir si la présence d'un gel de fibrine pouvait améliorer le succès de la greffe au bout de 21 jours. On a premièrement essayé de créer des gels avec un système de double injection composé de deux seringues dont l'une contient le fibrinogène et les cellules et l'autre la thrombine. Les deux seringues sont raccordées de telle sorte que les produits se mélangent au moment de l'injection provoquant ainsi la polymérisation du gel *in situ*. Cette technique s'est avérée inutilisable dans nos conditions expérimentales étant donné le volume mort trop important et la polymérisation non contrôlée dans les canalicules du système.

On a ensuite modifié la méthode de greffe. On ouvre à l'aide d'un scalpel le *Tibialis anterior* de souris RAG (Recombination Activating System) où on dépose la suspension cellulaire. On compare deux conditions expérimentales : soit on dépose les cellules resuspendues dans l'HBSS (condition contrôle) ou les cellules resuspendues dans une solution de fibrinogène et de thrombine pour provoquer la polymérisation *in situ*. Après 21 jours, les souris sont sacrifiées, les *Tibialis anterior* récoltés et congelés dans du Cryomatrix. Les muscles sont ensuite coupés au cryostat et on procède à une immunohistochimie dirigée contre la dystrophine humaine. Le nombre de fibres positives pour la dystrophine humaine représente le succès de greffe. Dans le contrôle (Figure 20 A), on a obtenu une moyenne de 49 fibres positives pour la dystrophine tandis que pour les cellules implantées en gel de fibrine (Figure 20 B) nous avons obtenu une moyenne de 125 fibres positives (Figure 20 C). Cela représente un succès de greffe 2,5 fois plus élevé.

On a ensuite voulu se rapprocher de la technique conventionnelle d'implantation de myoblastes soit la microinjection. Un test *in vivo* a été effectué afin de voir si l'implantation de cellules en gel de fibrine améliore la survie des myoblastes implantés au bout de 5 jours (moment où l'on retrouve le plus de mortalité). On a microinjecté dans le *Tibialis anterior* de souris RAG 0,5 millions de cellules dont l'ADN est marqué au  $^{14}\text{C}$  resuspendues soit dans l'HBSS (condition contrôle) ou dans un mélange de fibrinogène et de thrombine fait à la dernière minute afin d'éviter une polymérisation prématurée. Après 5 jours suite à la chirurgie, les souris sont sacrifiées, les *Tibialis anterior* sont récoltés puis congelés dans l'azote liquide. La radioactivité contenue dans un muscle est évaluée au jour de la greffe (jour 0) ainsi que cinq jours après la greffe. Les résultats obtenus au jour 5 sont rapportés par rapport au jour 0 exprimant ainsi le pourcentage de survie. Les cellules implantées dans l'HBSS survivent dans une proportion de 4,7 % tandis que celles implantées dans le gel de fibrine survivent dans une proportion de 7,5 % ce qui constitue un pourcentage de survie cellulaire significativement plus élevé (Figure 21).



**Figure 20 : Succès de greffe.** Après 21 jours, les *Tibialis anterior* des souris sont récoltés, congelés et coupés au cryostat. On procède à une immunohistochimie dirigée contre la dystrophine humaine sur les muscles contrôles c'est-à-dire greffés avec des myoblastes resuspendus dans l'HBSS (**A**) et sur les muscles ayant été greffés avec des myoblastes resuspendue en fibrine (**B**). Le succès de la greffe se traduit par le nombre moyen de fibres exprimant la dystrophine dans une coupe transversale de muscle (**C**). (n = 4 ; \* = p < 0,05)



**Figure 21 : Survie cellulaire.** Au moment de la greffe (jour 0) de myoblastes ainsi que cinq jours après (jour 5), les *Tibialis anterior* des souris sont récoltés, digérés et leur radioactivité est mesurée en désintégrations par minute (dpm). Ces valeurs sont converties en pourcentage de survie par rapport au jour 0. (n = 7 ; \* = p < 0,05)

## 4.4 Discussion

Le but de cette étude était de déterminer si un gel de fibrine pouvait améliorer la survie des myoblastes implantés *in vivo* en offrant un support matriciel aux cellules permettant ainsi de contourner le phénomène de mort par anoïkis.

L'observation des myoblastes humains cultivés en gel de fibrine nous a permis de constater plusieurs faits. D'abord, les cellulesensemencées en gel de fibrine y survivent, y prolifèrent et ont la capacité de dégrader le gel de fibrine en absence d'aprotinine dans le milieu de culture. Lors de cette étude, on a pu observer cette dégradation en environ 7 jours, le groupe de Huang en 2005 a plutôt observé une dégradation en 3 à 4 semaines (Huang, Dennis et al. 2005). Cependant, alors qu'on utilise des concentrations près des concentrations physiologiques, 500  $\mu$ L de fibrinogène à 3 mg/mL et 15  $\mu$ L de thrombine à 50 U/mL, ce groupe a utilisé une concentration plus élevée de fibrinogène soit 20 mg/mL. Augmenter la concentration en thrombine réduit le temps de polymérisation des gels alors qu'augmenter la concentration en fibrinogène augmente la densité et la solidité du gel ce qui explique cette différence (Jeon, Ryu et al. 2005; Wolberg and Campbell 2008).

De plus, les myoblastes se fusionnent, ou se différencient, lorsque cultivés en gel de fibrine sur une période d'une semaine malgré que le milieu de culture utilisé ne soit pas un milieu de fusion et surtout que les cellules ne soient pas confluentes (Figure 18 B). Ceci prouve que la fibrine constitue un environnement 3D dans lequel la culture des myoblastes est possible et que cet environnement est favorable à la fusion des myoblastes en myotubes tels que décrit par l'équipe de Huang en 2005 avec les myoblastes de rats. De plus, les petites fibres musculaires produites sont organisées et fonctionnelles (Huang, Dennis et al. 2005).

On a voulu étudier l'activité métabolique des cellulesensemencées en gel de fibrine. Les résultats du test XTT a révélé qu'au cours du temps, l'activité métabolique des cellules augmentait de manière croissante (Figure 19). Le gel de fibrine constitue donc un support adéquat pour l'étude *in vitro* des myoblastes en 3D.

En cultivant les myoblastes dans le gel de fibrine en 3D, on pourrait donc développer un modèle de fibres musculaires reconstruites *in vitro*. Ce modèle serait plus proche de la réalité que les cellules cultivées en monocouche entre autres pour l'étude des interactions entre les cellules.

On a ensuite voulu vérifier si l'implantation de cellules resuspendues dans un gel de fibrine allait améliorer le succès de la greffe. L'analyse des coupes nous a permis de constater un succès de greffe significativement 2,5 fois plus élevé lors de l'implantation des cellules en gel de fibrine (Figure 20). Pour cette expérimentation, on a développé une technique de greffe dans laquelle on ouvre le muscle, on dépose les cellules et les composantes du gel de fibrine, puis on referme le muscle. Cette technique a l'avantage de permettre de constater visuellement la polymérisation du gel implanté au moment de la chirurgie.

Beier, Stern-Straeter et collaborateurs avaient d'ailleurs démontré en 2006 qu'il est possible de déposer un gel de fibrine dans lequel sont resuspendus des myoblastes de rat afin de combler un trou dans le muscle causé par l'excision d'une tumeur (Beier, Stern-Straeter et al. 2006). Leur technique diffère de la nôtre par rapport à la méthode d'injection : alors qu'on dépose les cellules resuspendues dans une solution de thrombine et de fibrinogène, ils utilisent un système raccordant deux seringues comme avec le kit vendu pour l'utilisation clinique (Tisseel, Duploject System, Baxter Hyland Immuno). De plus, cette équipe n'a pas procédé à l'analyse de la mortalité cellulaire suite à l'implantation comme nous l'avons fait. Aussi, les expériences de cette équipe ont été effectuées chez le rat. Les souris possédant des muscles moins volumineux que ceux des rats, il est en effet plus complexe d'utiliser le système de double seringue conçu pour implanter des volumes plus importants.

Lorsqu'on regarde l'immunohistochimie dirigées contre la dystrophine, on peut constater que, vers le centre du gel, certaines fibres sont de petits diamètres. Bien que cela reste à confirmer, on peut émettre l'hypothèse que ces petites fibres sont le résultat de la fusion des myoblastes implantés entre-eux et non avec les fibres abîmées environnantes. Cela voudrait dire que le gel de fibrine constitue un biomatériau favorisant la formation de fibres orientées correctement constituées uniquement de cellules du donneur. Il faudrait cependant vérifier que ces fibres sont innervées et fonctionnelles.

Suite à ce résultat, on a voulu déterminer si l'implantation en gel de fibrine contribue à l'augmentation de la survie cellulaire à l'aide de la thymidine radiomarquée au  $^{14}\text{C}$ . L'analyse de la radioactivité a démontré une augmentation significative de la survie cellulaire de 4,7 % à 7,5 % (Figure 21). On a modifié la technique de greffe afin de se rapprocher de celle déjà utilisé au laboratoire et décrit par Skuk et al. en 2007 et consistant en de multiples injections répétées dans l'ensemble du muscle (Skuk, Goulet et al. 2007). De plus, la technique consistant à couper le muscle, puis le suturer n'est pas une technique de greffe envisageable chez l'homme. Ce résultat nous permet d'émettre l'hypothèse que l'augmentation du succès de greffe est due à une baisse de la mort cellulaire précoce par anoïkis puisque les cellules sont en contact avec une matrice.

Bien qu'une augmentation, même significative, d'environ 3 % de survie semble faible comparée aux 75 % de mort précoce observée dans les quatre premiers jours suivant l'implantation, le gel de fibrine pourra en plus contenir différents facteurs qui seront libérés au cours de la dégradation du gel et permettront de contourner d'autres mécanismes causant la mort cellulaire.

## 4.5 Conclusions et perspectives

On a pu démontrer que le gel de fibrine constitue un support de culture 3D valide pour les myoblastes dans lequel les cellules survivent, prolifèrent et se différencient. Le gel de fibrine a aussi permis d'augmenter le succès de la greffe de myoblastes ainsi que la survie des myoblastes implantés.

*In vitro*, le taux de fusion des cellules ensemencées en gel de fibrine devra être évalué par immunobuvardage de type Western et par RT-PCR pour la MHC (chaîne lourde de la myosine). On tentera aussi de visualiser cette protéine par immunocytochimie dirigée contre la MHC sur les myoblastes ensemencés en gel de fibrine.

*In vivo*, on évaluera le succès de greffe à 21 jours après l'implantation avec la technique de la microgreffe.

Les expériences *in vivo* et *in vitro* décrites devront être reprises avec différentes concentrations de fibrinogène. La variation de la concentration en fibrinogène permet d'influencer la solidité du gel et, par conséquent, son temps de dégradation. On envisage aussi d'ajouter des facteurs de croissance au gel de fibrine lors de l'implantation de myoblastes *in vivo*. Par exemple, l'HGF qui est un facteur de croissance impliqué dans la régénération musculaire et qui a la propriété de favoriser la survie des myoblastes (Greffe, Kuijpers-Jagtman et al. 2007) pourrait contribuer à l'augmentation du succès de greffe. En effet, la résorption naturelle et progressive du gel de fibrine permettra de libérer graduellement et continuellement le facteur de croissance sur une période donnée à l'intérieur du muscle. (Jeon, Ryu et al. 2005)

Finalement, le gel de fibrine permettrait de contourner deux obstacles majeurs à la thérapie cellulaire en fournissant aux myoblastes l'attachement nécessaire pour contourner la mort cellulaire précoce par anoïkis et en permettant une libération continue, pour une période de temps donnée, de facteurs myogéniques permettant ainsi de stimuler la prolifération cellulaire *in vivo*.

**- CONCLUSION GÉNÉRALE -**

## CONCLUSION GÉNÉRALE

La thérapie cellulaire est une avenue dans le traitement de la dystrophie musculaire de Duchenne. Il reste cependant beaucoup de travail à effectuer afin de la rendre réellement applicable. La mort précoce des cellules musculaires est un des principaux obstacles de la thérapie cellulaire *via* l'injection intramusculaire de myoblastes.

Afin de contourner cet obstacle, les propriétés protéolytiques de la thrombine peuvent être exploitées soit par son action sur les PARs ou sur le fibrinogène, afin de créer la fibrine.

L'activation des PARs par la thrombine a la capacité de stimuler la prolifération cellulaire permettant ainsi de pallier à la mort précoce des cellules. On avait suggéré que la stimulation des cellules grâce à la thrombine permettrait de suffisamment stimuler la prolifération des myoblastes de manière transitoire afin de compenser pour la mort cellulaire précoce suite à l'implantation. Bien que la thrombine exerce un effet mitogénique sur les cellules *in vitro*, on n'est pas encore parvenu à exploiter cet effet afin d'augmenter le succès de la greffe.

D'autre part, on avait suggéré que la présence d'un gel de fibrine permet de fournir aux myoblastes une forme de matrice extra-cellulaire (ECM) et ainsi de réduire le phénomène de mort par anoïkis ou manque d'attachement. Le fait de fournir un gel de fibrine aux myoblastes a permis d'améliorer significativement le succès de la greffe de myoblastes. En plus, le gel de fibrine est un support permettant de cultiver les myoblastes dans un environnement 3D.

Ces résultats sont encourageants et démontrent que la thérapie cellulaire est toujours d'actualité. Bien qu'il y ait de plus en plus d'avancées concernant la thérapie génique, celle-ci utilise souvent des vecteurs viraux ce qui n'est pas sans risques. L'utilisation de produits non-immunogènes comme la thrombine et la fibrine pour favoriser la greffe myoblastes constitue donc une alternative intéressante pour le traitement des patients atteints de DMD.

## ANNEXE

TABLE 2  
Cellular, tissue, and systemic effects of PAR-1 activation

Tissue	Cell Type	Effect	References
Airway	Epithelium; trachea; fibroblasts; SM	↑ PDGF release; relaxation/contraction; ↑ prostanoid release; ↑ procollagen production; proliferation	Cicala et al., 1999; Cocks et al., 1999a; Hauck et al., 1999; Lan et al., 2000; Saifeddine et al., 2001; Shapiro et al., 1996; Shimizu et al., 2000
Blood	Platelets	Activation; degranulation; ↑ aggregation: ↑ $[Ca^{2+}]_{(i)}$ ; ↑ TXA <sub>2</sub>	Andersen et al., 1999; Henriksen et al., 1997; Kinlough-Rathbone et al., 1993; Vu et al., 1991
Bone	Osteoblasts	↑ $[Ca^{2+}]_{(i)}$ ; ↑ proliferation	Abraham and Mackie, 1999; Jenkins et al., 1993
Connective tissue	Synovial fibroblasts	↑ Proliferation; ↑ IL-6; ↑ GM-CSF	Shin et al., 1995, 1999
Cardiovascular system	Vascular SM; endothelium	Relaxation/contraction; mitogenesis; ↑ $[Ca^{2+}]_{(i)}$ ; ↑ von Willebrand factor release; ↑ NO release; ↑ P-selectin and ICAM expression	Emilsson et al., 1997; Garcia et al., 1993; Godin et al., 1995; Hwa et al., 1996; Jiang et al., 1998; Storck and Zimmermann, 1996; Sugama et al., 1992
Epidermis	Keratinocytes	↑ $[Ca^{2+}]_{(i)}$ ; ↑ proliferation; inhibits differentiation	Algermissen et al., 2000; Derian et al., 1997
Immune system	Monocytes; mast cells; T cells	↑ $[Ca^{2+}]_{(i)}$ ; ↑ IL-6; ↑ IL-1; ↑ TNF- $\alpha$ ; degranulation; activation	Mari et al., 1994; Naldini et al., 1998; Umarova et al., 2000
Intestine	SM	Relaxation/contraction	Cocks et al., 1999b; Kawabata et al., 2000b
Kidney	GEC; GMC	↑ Clusterin mRNA; ↑ TGF- $\beta$ release	Laping et al., 1997; Yamabe et al., 1997
Nervous system	Glia; astrocytes; neurones	↑ $[Ca^{2+}]_{(i)}$ ; ↑ proliferation; stellation reversal; neuronal apoptosis	Corvera et al., 1999; Debeir et al., 1997; Pindon et al., 1998; Turgeon et al., 1998
Skeletal muscle	Myocytes	↑ $[Ca^{2+}]_{(i)}$	Mbebi et al., 2001
Stomach	SM	Relaxation/contraction	Cocks et al., 1999b; Hollenberg et al., 1992; Yang et al., 1992

SM, smooth muscle; GEC, glomerular epithelial cells; GMC, glomerular mesangial cells; IL, interleukin; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ ; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor.

(Macfarlane, Seatter et al. 2001)

## Bibliographie

- Beier, J. P., J. Stern-Straeter, et al. (2006). "Tissue engineering of injectable muscle: three-dimensional myoblast-fibrin injection in the syngeneic rat animal model." Plast Reconstr Surg **118**(5): 1113-21; discussion 1122-4.
- Bhang, S. H., O. Jeon, et al. (2007). "Controlled release of nerve growth factor from fibrin gel." J Biomed Mater Res A **80**(4): 998-1002.
- Bode, W. (2006). "Structure and interaction modes of thrombin." Blood Cells Mol Dis **36**(2): 122-30.
- Bouchentouf, M., B. F. Benabdallah, et al. (2007). "Induction of Anoikis following myoblast transplantation into SCID mouse muscles requires the Bit1 and FADD pathways." Am J Transplant **7**(6): 1491-505.
- Breen, A., T. O'Brien, et al. (2009). "Fibrin as a Delivery System for Therapeutic Drugs and Biomolecules." Tissue Eng Part B Rev.
- Charge, S. B. and M. A. Rudnicki (2004). "Cellular and molecular regulation of muscle regeneration." Physiol Rev **84**(1): 209-38.
- Chevessier, F., D. Hantai, et al. (2001). "Expression of the thrombin receptor (PAR-1) during rat skeletal muscle differentiation." J Cell Physiol **189**(2): 152-61.
- Chinni, C., M. R. de Niese, et al. (1999). "Thrombin, a survival factor for cultured myoblasts." J Biol Chem **274**(14): 9169-74.
- Coughlin, S. R. (2000). "Thrombin signalling and protease-activated receptors." Nature **407**(6801): 258-64.
- de Niese, M. R., C. Chinni, et al. (2002). "Dissection of protease-activated receptor-1-dependent and -independent response to thrombin in skeletal myoblasts." Exp Cell Res **274**(1): 149-56.
- Di Cera, E., Q. D. Dang, et al. (1997). "Molecular mechanisms of thrombin function." Cell Mol Life Sci **53**(9): 701-30.
- Grefte, S., A. M. Kuijpers-Jagtman, et al. (2007). "Skeletal muscle development and regeneration." Stem Cells Dev **16**(5): 857-68.
- Greinacher, A. and T. E. Warkentin (2008). "The direct thrombin inhibitor hirudin." Thromb Haemost **99**(5): 819-29.
- Hosoyama, T., N. Ishiguro, et al. (2009). "Degenerative muscle fiber accelerates adipogenesis of intramuscular cells via RhoA signaling pathway." Differentiation **77**(4): 350-9.
- Huang, Y. C., R. G. Dennis, et al. (2005). "Rapid formation of functional muscle in vitro using fibrin gels." J Appl Physiol **98**(2): 706-13.
- Huang, Y. L., G. Y. Shi, et al. (2009). "Thrombin induces nestin expression via the transactivation of EGFR signalings in rat vascular smooth muscle cells." Cell Signal **21**(6): 954-68.
- Jeon, O., S. H. Ryu, et al. (2005). "Control of basic fibroblast growth factor release from fibrin gel with heparin and concentrations of fibrinogen and thrombin." J Control Release **105**(3): 249-59.
- Laurens, N., P. Koolwijk, et al. (2006). "Fibrin structure and wound healing." J Thromb Haemost **4**(5): 932-9.

- Le Grand, F. and M. A. Rudnicki (2007). "Skeletal muscle satellite cells and adult myogenesis." *Curr Opin Cell Biol* **19**(6): 628-33.
- Levenberg, S., J. Rouwkema, et al. (2005). "Engineering vascularized skeletal muscle tissue." *Nat Biotechnol* **23**(7): 879-84.
- Macfarlane, S. R., M. J. Seatter, et al. (2001). "Proteinase-activated receptors." *Pharmacol Rev* **53**(2): 245-82.
- Mackie, E. J., L. H. Loh, et al. (2008). "Protease-activated receptors in the musculoskeletal system." *Int J Biochem Cell Biol* **40**(6-7): 1169-84.
- Nowak, K. J. and K. E. Davies (2004). "Duchenne muscular dystrophy and dystrophin: pathogenesis and opportunities for treatment." *EMBO Rep* **5**(9): 872-6.
- Orfeo, T., K. E. Brummel-Ziedins, et al. (2008). "The nature of the stable blood clot procoagulant activities." *J Biol Chem* **283**(15): 9776-86.
- Peault, B., M. Rudnicki, et al. (2007). "Stem and progenitor cells in skeletal muscle development, maintenance, and therapy." *Mol Ther* **15**(5): 867-77.
- PPMD (2008). Leading the fight to Duchenne. **2009**.
- Radosevich, M., H. I. Goubran, et al. (1997). "Fibrin sealant: scientific rationale, production methods, properties, and current clinical use." *Vox Sang* **72**(3): 133-43.
- Roberts, R. G. (2001). "Dystrophins and dystrobrevins." *Genome Biol* **2**(4): REVIEWS3006.
- Sampaolesi, M., S. Blot, et al. (2006). "Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs." *Nature* **444**(7119): 574-9.
- SEER (2009). Anatomy & Physiology, Muscular system. **2009**.
- Sigma-Aldrich (2009). Fibrinogen/Fibrin. **2009**.
- Sigma-Aldrich (2009). Thrombin Factor IIa. **Jan**.
- Skuk, D., M. Goulet, et al. (2007). "First test of a "high-density injection" protocol for myogenic cell transplantation throughout large volumes of muscles in a Duchenne muscular dystrophy patient: eighteen months follow-up." *Neuromuscul Disord* **17**(1): 38-46.
- Skuk, D. and J. P. Tremblay (2001). ""Engineering" myoblast transplantation." *Graft* **4**(8): 558-70.
- Skuk, D., J. T. Vilquin, et al. (2002). "Experimental and therapeutic approaches to muscular dystrophies." *Curr Opin Neurol* **15**(5): 563-9.
- Suidan, H. S., S. P. Niclou, et al. (1996). "The thrombin receptor is present in myoblasts and its expression is repressed upon fusion." *J Biol Chem* **271**(46): 29162-9.
- Tortora, G. J. and S. R. Grabowski (2002). Chapitre 10 : Le tissu musculaire. *Principes d'anatomie et de physiologie*. D. B. Université. Montréal: 284-395.
- Tremblay, J. P. and J. T. Vilquin (2001). "La transplantation de myoblastes normaux ou génétiquement modifiés pour le traitement de maladies héréditaires ou acquises." *Journal de la Société de Biologie* **195**(1): 29-37.
- Tyler, K. L. (2003). "Origins and early descriptions of "Duchenne muscular dystrophy"." *Muscle Nerve* **28**(4): 402-22.
- Uaesoontrachoon, K., H. J. Yoo, et al. (2008). "Osteopontin and skeletal muscle myoblasts: association with muscle regeneration and regulation of myoblast function in vitro." *Int J Biochem Cell Biol* **40**(10): 2303-14.
- Weisel, J. W. (2005). "Fibrinogen and fibrin." *Adv Protein Chem* **70**: 247-99.
- Winder, S. J. (1997). "The membrane-cytoskeleton interface: the role of dystrophin and utrophin." *Journal of Muscle Research and Cell Motility* **18**(6): 617-629.

Wolberg, A. S. and R. A. Campbell (2008). "Thrombin generation, fibrin clot formation and hemostasis." Transfus Apher Sci **38**(1): 15-23.

|