



Fractionnement et analyse de fluides biologiques stimulant la prolifération des myoblastes humains

Mémoire

Hanan Chaabane

**Maîtrise en génie chimique
Maître ès sciences (M.Sc.)**

Québec, Canada

© Hanan Chaabane, 2015

Résumé

Une des thérapies cellulaires pour le traitement de la Dystrophie Musculaire de Duchenne consiste à greffer aux patients des myoblastes provenant de donneurs sains. Ces myoblastes doivent être cultivées dans un milieu contenant du sérum foetal bovin (FBS), or, cet additif n'est pas souhaitable dans le cadre d'une thérapie cellulaire. En effet, la présence de FBS dans le milieu de culture présente un problème de sécurité pour la santé humaine. Par ailleurs, les protéines qui composent le FBS sont très nombreuses et se trouvent dans des proportions extrêmement déséquilibrées. Identifier les protéines responsables de l'activité du FBS constitue donc un défi de taille.

L'objectif global de ce projet est de mettre au point une série de méthodes de fractionnement de fluides biologiques, le FBS et le colostrum bovin, dans l'espoir de découvrir des fractions définies stimulant la croissance des myoblastes.

Dans cette étude, les procédures de fractionnement du FBS choisies sont de trois types: l'électrodialyse sur membrane d'ultrafiltration, ainsi que deux méthodes affinitaires. D'autre part, du colostrum bovin dénommé, LP1.5, provenant de la société Métanature, a été testé pour son effet sur la prolifération des myoblastes.

Les résultats montrent que le fractionnement du FBS a été réalisé avec succès. Néanmoins, les fractions obtenues n'ont pas montré d'effet significatif sur la croissance des myoblastes. En ce qui concerne les travaux avec le colostrum bovin, les fractions obtenues ont montré un effet stimulant sur la croissance des myoblastes, en présence d'une concentration réduite en FBS.

Table des matières

Résumé.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures.....	xi
Remerciements.....	xv
Chapitre 1. Introduction.....	1
1.1 Justification.....	2
1.2 État de l’art.....	2
1.3 Objectifs.....	3
1.4 Résumé de la méthodologie.....	4
Chapitre 2. Synthèse de la littérature.....	5
2.1 La Dystrophie Musculaire de Duchenne.....	5
2.1.1 Description et caractéristiques.....	5
2.1.2 Thérapie pharmaceutique.....	6
2.1.3 Thérapie génétique.....	6
2.1.4 Thérapie cellulaire.....	8
2.2 Les fluides biologiques.....	10
2.2.1 Origine du sérum foetal bovin (FBS).....	10
2.2.2 Composition globale du FBS.....	10
2.2.3 Protéome et défis de leur élucidation.....	12
2.2.4 Rôle du FBS.....	13
2.2.5 Les limites du sérum pour la culture cellulaire à usage thérapeutique.....	13
2.3 Le colostrum bovin.....	14
2.3.1 Qu’est-ce que le colostrum ?.....	14
2.3.2 Composition globale.....	15
2.3.3 Intérêts de l’utilisation de colostrum bovin pour la culture des cellules.....	15

2.4	Développement de milieux sans sérum pour la culture des myoblastes	16
2.5	Bioséparation des molécules biologiques	21
2.5.1	Généralités	21
2.5.2	Propriétés fondamentales des biomolécules	21
2.5.3	Séparation par ultrafiltration.....	23
2.5.4	Ultrafiltration sur des cartouches centrifugeables	24
2.6	Électrodialyse sur membrane d'ultrafiltration (EDUF)	24
2.6.1	Généralités	24
2.6.2	Principe du procédé d'EDUF	25
2.6.3	Effet du pH des solutions	26
2.6.4	Rôle des membranes dans le système EDUF	27
2.7	Séparation par méthode affinitaire.....	27
2.7.1	Adsorbants pour lier l'albumine.....	28
2.8	Fractionnement par une librairie d'hexapeptides	29
Chapitre 3.	Matériel et Méthodes	33
3.1	Matériel.....	33
3.2	Équipements.....	34
3.3	Protocoles expérimentaux	36
3.3.1	Décongélation des cellules	36
3.3.2	Culture cellulaire	36
3.3.3	Passage cellulaire.....	36
3.3.4	Compte cellulaire à l'hémacymètre.....	37
3.3.5	Congélation des cellules.....	37
3.3.6	Dosage de protéines par Bradford.....	38
3.3.7	Électrophorèse sur gel (SDS-PAGE).....	38
3.3.8	Identification des protéines par spectroscopie de masse LC-MS-MS... 39	
3.3.9	Effet de différentes fractions du FBS sur la croissance cellulaire	40
3.3.10	Suivi de la morphologie cellulaire	40

3.3.11	Détermination de la teneur en matière sèche.....	41
3.3.12	Fractionnement/concentration du fluide biologique FBS	41
Chapitre 4.	Résultats et Discussion	47
4.1	Fractionnement du FBS par le procédé d'électrodialyse avec membrane d'ultrafiltration	47
4.1.1	Mesure de la conductivité.....	47
4.1.2	Migration totale des protéines	48
4.1.3	Gel d'électrophorèse des fractions d'EDUF	49
4.2	Fractionnement du FBS par affinité sur une librairie d'hexapeptides ...	52
4.2.1	Détermination des pourcentages de protéines éluées	52
4.2.2	Électrophorèse sur gel SDS-PAGE des fractions de la librairie d'hexapeptides	54
4.3	Fractionnement du FBS par chromatographie d'affinité sur bleu de Cibacron	56
4.3.1	Effet des conditions d'opération sur le fractionnement.....	56
4.3.2	Électrophorèse sur gel SDS-PAGE des fractions du FBS obtenues par la chromatographie d'affinité au bleu de Cibacron	58
4.3.3	Test en culture cellulaire	60
4.4	Caractérisation chimique du colostrum LP1.5	67
4.4.1	Détermination de la teneur en protéine	67
4.4.2	Détermination de la teneur en matière sèche.....	67
4.4.3	Électrophorèse sur gel SDS-PAGE.....	68
4.4.4	Identification des protéines par spectroscopie de masse	69
4.5	Effet du LP1.5 sur la culture de myoblastes humains.....	70
4.5.1	Essais préliminaires	70
4.5.2	Essais avec LP1.5 concentré	73
4.5.3	Essais avec LP1.5 diafiltré	74
4.5.4	Test de l'effet du LP15xd sur des myoblastes cultivées dans le milieu LOBSFM	83
Chapitre 5.	Conclusion et Perspectives	89

Références bibliographiques 93
Annexes..... 99

Liste des tableaux

Tableau 1: Composition du supplément SF développé par Ham (Ham et al, 1988)	17
Tableau 2: Composition du milieu MB1 avec sérum développé après modification des suppléments de Ham	17
Tableau 3: Composition des milieux de base.....	18
Tableau 4: Composition du milieu sans sérum, LOBSFM, développé dans notre laboratoire pour la culture des myoblastes.....	20
Tableau 5 : Composition du tampon de migration Tris-glycine10X	39
Tableau 6 : Composition du tampon de dépôt des protéines	39
Tableau 7: Évolution du pH dans le compartiment du perméat (KCL) et dans le compartiment du FBS durant le processus d'EDUF	52
Tableau 8 : Fractionnement du FBS sur colonne Proteominer ^{MD} de 2 ml sous différentes conditions de charge	53
Tableau 9 : Fractionnement du FBS sur une colonne Cibacron F3G-A de 5 ml, sous différentes conditions.....	58
Tableau 10: Composition et résultats de croissance au jour 7 des fractions du FBS obtenues par fractionnement sur colonne Hitrap Blue HP	61
Tableau 11: Composition et résultats de croissance au jour 7 des fractions du FBS obtenues par la diafiltration	64
Tableau 12 : Composition la plus probable des 7 bandes majeures du SDS-PAGE de LP1.5.....	69
Tableau 13 : Composition des mélanges de LP1.5 et de FBS pour les essais préliminaires.....	70
Tableau 14 : Composition des mélanges de LP1.5 concentré 10X (LP10X) et du FBS pour les essais préliminaires.....	73
Tableau 15 : Composition et résultats de croissance au jour 7 des mélanges de LP15Xd et du FBS	75
Tableau 16 : Composition et croissance des myoblastes au jour 7 pour des mélanges de colostrum LP15Xd et du FBS	79

Tableau 17 : Composition et croissance des myoblastes au jour 7 pour des mélanges de colostrum LP15Xd et du FBS..... 84

Liste des figures

Figure 1: Protéome du plasma humain (Anderson et Anderson, 2002).	12
Figure 2: Configuration de la cellule d'EDUF pour le fractionnement de fluides biologiques.	26
Figure 3: Structure moléculaire du ligand Cibacron bleu F3G-A (Odabaşı et Denizli, 2004).	29
Figure 4: Représentation schématique du principe de fractionnement d'un fluide biologique par la technique de la librairie d'hexapeptides.	31
Figure 5: Évolution de la conductivité de la solution de perméat et de la solution du FBS en fonction du temps durant le procédé d'EDUF.	48
Figure 6: Évolution de la concentration en protéines dans les compartiments du perméat et du FBS.	49
Figure 7: Analyse SDS-PAGE de protéines de la solution de perméat durant 4 heures d'EDUF.	51
Figure 8: 1/charge du FBS déposée sur les billes d'hexapeptides vs % des protéines retenues.	54
Figure 9: Analyse SDS-PAGE des fractions du FBS fractionnées par librairie d'hexapeptides.	55
Figure 10: Analyse SDS-PAGE des fractions du FBS séparées par la colonne d'affinité.	60
Figure 11: Effet des fractions du FBS obtenues sur la colonne Hitrap Blue HP. Profil de croissance des myoblastes durant 7 jours de culture.	62
Figure 12: Effet des fractions de la colonne Hitrap Blue HP. Microscopie 20X au jour 3.	62
Figure 13: Effet des fractions de la colonne Hitrap Blue HP. Microscopie 20X au jour 5.	63
Figure 14 : Effet des fractions de la colonne Hitrap Blue HP. Microscopie 20X au jour 7.	63
Figure 15: Effet de la diafiltration du FBS. Profil de croissance des myoblastes durant 7 jours de croissance cellulaire.	65
Figure 16 : Effet de la diafiltration du FBS. Microscopie 20X au jour 3.	66

Figure 17: Effet de la diafiltration du FBS. Microscopie 20X au jour 5.....	66
Figure 18: Effet de la diafiltration du FBS. Microscopie 20X au jour 7.....	67
Figure 19: Analyse SDS-PAGE du LP1.5. Piste 1 : Étalon de masses moléculaires; Pistes 2 & 4 : LP1.5; Pistes 3 & 5 : FBS.	68
Figure 20: Essais préliminaires. Profil de croissance des myoblastes pour chaque condition durant 7 jours de culture.....	71
Figure 21: Essais préliminaires. Microscopie 20X au jour 3.	71
Figure 22: Effet du LP 1.5 - Essais préliminaires. Microscopie 20X au jour 5.	72
Figure 23: Effet du LP1.5-Essais préliminaires. Microscopie 20X au jour 7.	72
Figure 24: Effet du LP1.5 concentré. Microscopie 10X au jour 3.....	74
Figure 25: Effet de LP15Xd. Profil de croissance cellulaire des myoblastes durant 7 jours de culture.	76
Figure 26: Effet du LP15Xd; Microscopie 20X, jour 3.	76
Figure 27 : Effet du LP15Xd; Microscopie 20X, jour 5.	77
Figure 28: Effet du LP15Xd. Microscopie 20X, jour 7.	77
Figure 29: Effet du LP15Xd – plan factoriel complet; Profil de croissance cellulaire.	79
Figure 30 : Effet du LP15Xd – plan factoriel complet; Microscopie 20X au jour 3.	80
Figure 31: Effet du LP15Xd – plan factoriel complet; Microscopie 20X au jour 5.	81
Figure 32 : Effet du LP15Xd – plan factoriel complet; Microscopie 20X au jour 7.	82
Figure 33: Effet combiné du colostrum LP15Xd et du FBS sur la croissance cellulaire (données de concentration cellulaire au jour 7, reportée sur une échelle relative).....	83
Figure 34: Effet du LP15Xd en milieu conçu pour la culture sans sérum; Profil de croissance cellulaire des myoblastes cultivés dans le milieu LOBSFM durant 7 jours de culture.....	85
Figure 35: Effet du LP15Xd; Microscopie 20X au jour 3.	86
Figure 36: Effet du LP15Xd; Microscopie 20X au jour 5.	87
Figure 37: Effet du LP15Xd; Microscopie 20X au jour 7.	87
Figure 38:Chromatogramme de fractionnement de 1 ml du FBS par la colonne d'affinité Hitrap Blue HP avec un débit 1,5 ml/min.....	99

Figure 39: Chromatogramme de fractionnement de 0, 5 ml du FBS par la colonne d'affinité Hitrap Blue HP avec un débit 0,5 ml/min.	99
Figure 40: Chromatogramme de fractionnement de 1ml du FBS par la colonne d'affinité Hitrap Blue HP avec un débit 0,5 ml/min.	100
Figure 41: Chromatogramme de fractionnement de 2 ml du FBS par la colonne d'affinité Hitrap Blue HP avec un débit 0,5 ml/min.	100
Figure 42: Chromatogramme de fractionnement de 1ml du FBS dilué 1:1 par la colonne d'affinité Hitrap Blue HP avec un débit 0,5 ml/min.....	101

Remerciements

Je tiens à remercier chaleureusement le Dr Alain Garnier pour m'avoir accueilli dans son laboratoire. C'est pour moi un grand honneur d'être encadrée par vous. Je ne saurais exprimer toute ma reconnaissance et mes remerciements pour vos qualités humaines, votre gentillesse, votre patience et la rigueur scientifique que vous m'avez transmise durant ces deux ans.

Je tiens à remercier aussi l'équipe des professeurs B. Gaillet, J. Tremblay, et L. Bazinet de l'Université Laval ainsi que la compagnie Métanature pour l'aide et l'expertise indispensables apportées lors de certaines expérimentations réalisées.

J'exprime mes plus sincères remerciements à tous mes collègues du laboratoire qui m'ont apporté de l'aide pour acquérir de l'expertise pour la réalisation de ce travail et pour leur générosité, leurs conseils et leur gentillesse.

Finalement, merci à mes parents, mes frères et mon mari qui ont toujours cru en mes capacités et qui m'ont supporté tout au long de mon cursus universitaire.

Chapitre 1. Introduction

La Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD) est une maladie héréditaire fatale qui découle d'une mutation du gène de la dystrophine. Cette myopathie se manifeste par une dégénérescence progressive des fibres musculaires qui sont ensuite remplacées par des tissus adipeux. La prévalence de cette maladie est estimée à 1 cas sur 3500 pour les naissances masculines et l'espérance de vie de ces patients est limitée à 30 ans (Malik, Rodino-Klapac et Mendell, 2012). Malgré que plus de 150 années se soient écoulées depuis l'identification des premiers cas de DMD, aucun traitement curatif n'existe à ce jour (Goyenvalle et al, 2011). Par conséquent, il est important de développer des thérapies efficaces et durables afin de résoudre les problèmes liés à une telle situation.

La thérapie cellulaire pour le traitement de la DMD a connu une attention particulière au cours des dernières années. Une approche consiste à transplanter des myoblastes, prélevées sur des donneurs sains, en présence d'immunosuppresseurs, dans les muscles des patients afin de réparer les fibres musculaires endommagées et de corriger le défaut génétique (Konieczny, Swiderski et Chamberlain, 2013). Étant donné que le nombre de myoblastes obtenu des donneurs (quelques millions de cellules) est insuffisant pour effectuer cette thérapie (de 10^9 à 10^{12} cellules requises), la prolifération des cellules prélevées en bioréacteur est essentielle. Un des problèmes lié à ce type de thérapie est que les myoblastes nécessitent, dans leur milieu de culture, un fluide biologique d'origine animale, soit du sérum foetal bovin (FBS) pour stimuler leur croissance.

Le FBS est une source riche de plusieurs composants qui stimulent la croissance des cellules telles que les protéines, les facteurs de croissance, les hormones, les lipides et les minéraux. Ce fluide est très complexe et sa composition complète n'est pas encore déterminée. D'ailleurs, il est estimé que jusqu'à 10 000 protéines peuvent être communément présentes dans le sérum (Adkins et al, 2002). En

outre, le FBS se caractérise par une grande hétérogénéité inter-lots, ce qui pourrait influencer la reproductibilité des résultats, ainsi que représenter un risque potentiel de contamination biologique (van der Valk et al, 2004). Il est fortement recommandé par les autorités règlementaires d'utiliser des milieux chimiquement définis qui ne contiennent pas des dérivés de produits animaux pour la culture des cellules qui seront utilisées en thérapie. Cette situation motive le développement de milieux de culture sécuritaires et performants (van der Valk et al, 2004), desquels seront exempts des extraits biologiques tels le FBS.

1.1 Justification

La complexité de la composition du sérum se traduit par le large spectre de concentration des protéines qui le composent, variant du pg/ml jusqu'aux dizaines de mg/ml (Colantonio et al, 2005). Jusqu'à aujourd'hui, il n'existe aucune méthode de détection qui permette une identification et une quantification précises des protéines sériques sur une plage dynamique d'environ 10 ordres de grandeur (Bandow, 2010). En particulier, il est difficile de détecter les protéines de faible abondance, qui constituent probablement une source importante d'effecteurs potentiels, au travers un petit nombre de protéines de très grande concentration. Parmi les différentes stratégies qui peuvent être adoptées pour surmonter ce problème, les méthodes de fractionnement et/ou de déplétion de protéines hautement abondantes ont souvent été appliquées au sérum sanguin humain (Guerrier, Righetti et Boschetti, 2008b). Bien qu'une variété de technologies soient accessibles pour la déplétion de protéines de haute abondance à partir d'échantillons de sérum humain, ceci principalement afin d'identifier des biomarqueurs associés à des pathologies, il ne semble pas que ces méthodes aient été testées et/ou adaptées pour le FBS (Faulkner et al, 2011).

1.2 État de l'art

L'élimination du FBS d'un milieu de culture pour les myoblastes, tout en préservant la vitesse et le niveau de croissance des cellules ainsi que leurs caractéristiques (morphologie et fonctionnalité), reste encore un défi de taille. Dans nos

laboratoires, Victor Parent (étudiant au Ph.D.) a développé un milieu sans sérum défini nommé LOBSFM pour la culture des myoblastes suite à une étude exhaustive des effets individuels et synergiques de 70 additifs et 6 milieux de base. Ce milieu permet 1) une croissance des myoblastes comparable à celle d'un milieu standard (contenant du FBS), 2) de maintenir l'expression de marqueurs cellulaires spécifiques aux myoblastes durant de longues périodes de culture, notamment la desmine et la chaîne lourde de la myosine (MHC), et 3) de maintenir la capacité de ces cellules à fusionner pour former des myofibres dans un test de fonctionnalité *in vitro* (Parent et al, 2009). Néanmoins, le milieu LOBSFM ne permet pas de maintenir exactement la même morphologie cellulaire que le milieu standard et les cellules proliférées dans ce milieu ne semblent pas avoir la même capacité à se greffer aux muscles de souris lors d'essais de fonctionnalité *in vivo*.

1.3 Objectifs

L'hypothèse fondamentale de ce travail est qu'il est possible de fractionner le FBS de manière à trouver une fraction, ou une combinaison de fractions, permettant de maintenir l'effet du FBS sur la croissance des myoblastes humains. Ultiment, en poursuivant ce processus de fractionnement, entrecoupé de test d'activité mitogénique, il devrait être possible d'isoler les principes actifs dans le FBS qui sont responsables de la croissance des myoblastes.

Dans une première partie, ce projet vise à développer une série de méthodes de fractionnement qui permettrait de séparer les protéines du FBS et d'obtenir des fractions qui assureraient une croissance satisfaisante de myoblastes fonctionnelles. Pour cela, les méthodes proposées visent l'isolement de facteurs ou mélange de facteurs qui ont un effet positif sur la croissance des myoblastes et qui maintiennent les fonctions cellulaires au cours de la transplantation.

Dans une deuxième partie, ce projet consiste à tester le colostrum bovin pour son effet sur la croissance des cellules. Il s'agit d'un fluide biologique plus sécuritaire que le FBS, qui se caractérise par sa composition riche en molécules bioactives. Le produit testé est dénommé LP1.5 produit par la société Méτανature. Cette étude

a pour but de tester le remplacement partiel ou total du FBS par du LP1.5 pour faire croître les myoblastes et aussi de tester l'effet de ce supplément pour améliorer les performances du milieu sans sérum, le LOBSFM, duquel le FBS a déjà été éliminé.

1.4 Résumé de la méthodologie

Trois différentes approches de fractionnement de FBS ont été testées, à savoir, le procédé d'électrodialyse par membrane d'ultrafiltration (EDUF), procédé développé par le Professeur Laurent Bazinet, Université Laval (Bazinet et Firdaous, 2009), ainsi que les méthodes affinitaires basées soit sur une librairie d'hexapeptides (ProteoMiner^{MD}, Bio-Rad), ou l'affinité du Cibacron bleu F3G-A pour l'albumine. Par la suite, les fractions de FBS obtenues par chaque méthode ont été ultrafiltrées dans des cartouches d'ultrafiltration centrifugeables de 3 kDa puis testées pour leur effet sur la prolifération des myoblastes.

Dans la deuxième partie de ce travail, une détermination de la teneur en protéines et en matières sèches du colostrum bovin LP1.5 a été menée, ainsi que l'identification de ses protéines majeures par spectrométrie de masse. Suite à différents traitements, le colostrum a également été testé seul et en combinaison avec le FBS pour sa capacité à soutenir la prolifération des myoblastes. Les progrès réalisés vis à vis ces objectifs seront décrits dans ce mémoire.

Chapitre 2. Synthèse de la littérature

2.1 La Dystrophie Musculaire de Duchenne

2.1.1 Description et caractéristiques

La Dystrophie Musculaire de Duchenne est une maladie héréditaire qui découle d'une mutation du gène de la dystrophine localisé dans le locus Xp21.2. La mutation produit une protéine tronquée et non fonctionnelle. D'ailleurs, la présence de cette protéine indispensable au maintien de l'architecture cellulaire et son absence induit un affaiblissement progressif des fibres musculaires.

Le caractère pathologique de la DMD se manifeste par une dégénérescence progressive des fibres musculaires qui sont ensuite remplacées par des tissus adipeux. La maladie est détectée tôt dans la vie. À la naissance, les niveaux de créatine kinase sérique sont élevés et la parole est souvent retardée. Entre l'âge de 3 et 5 ans, la motricité est souvent réduite se traduisant par des chutes fréquentes et par une difficulté de courir. Vers l'âge de 12 ans, les patients perdent la capacité de se déplacer (Rodino-Klapac, Mendell et Sahenk, 2013). L'espérance de vie de ces patients est limitée à 30 ans (Malik, Rodino-Klapac et Mendell, 2012).

Malgré que plus de 150 années se soient écoulées depuis l'identification des premiers cas de DMD, aucun traitement curatif n'existe pour le traitement des personnes atteintes de cette maladie. Les moyens palliatifs qui sont disponibles se limitent notamment à améliorer la qualité de vie des patients tels que des séances de physiothérapies, le déplacement en chaises roulantes ainsi que des traitements aux corticostéroïdes, afin d'augmenter la force des muscles (Bogdanovich et al, 2004).

Cette situation stimule la recherche de thérapies efficaces et durables afin de résoudre les problèmes liés à cette situation. Trois stratégies sont présentement en développement, nommément les thérapies pharmaceutique, génétique et cellulaire.

2.1.2 Thérapie pharmaceutique

Au cours des quatre dernières décennies, de nombreuses études ont été publiées sur l'utilisation des corticostéroïdes pour le traitement de la DMD. Les médicaments les plus couramment utilisés sont notamment la prednisone, la prednisolone et le déflazacort. Le mécanisme précis par lequel ces stéroïdes peuvent augmenter la force des patients atteints de la DMD n'est pas encore bien connu, mais leurs effets bénéfiques comprennent l'inhibition de la protéolyse musculaire, la stimulation de la prolifération des myoblastes, la stabilisation des membranes des fibres musculaires et l'augmentation de la réparation myogénique (Wong et Christopher, 2002). Néanmoins, l'administration à long terme de ces corticostéroïdes peut être limitée dans certains cas par des effets secondaires tels l'hypertension, la formation de cataractes, une perte de densité osseuse, la compression vertébrale et des fractures osseuses.

2.1.3 Thérapie génétique

Les personnes atteintes de la DMD sont des sujets intéressants pour la thérapie génique puisqu'il s'agit d'une anomalie qui découle d'une mutation génique. En effet, lorsque le gène de la dystrophine a été identifié pour la première fois en 1987 (Hoffman, Brown et Kunkel, 1987), il a été prévu que la thérapie génique pour cette maladie suivrait peu de temps après. Cependant, malgré de nombreuses avancées, le développement d'une thérapie génique efficace pour traiter la DMD reste toujours confronté à des défis importants (Goyenvalle et al, 2011).

La thérapie génique pour la DMD nécessite la livraison d'un nouveau gène de la dystrophine à tous les muscles du corps, qui constituent plus de 40% de la masse corporelle, y compris le diaphragme et le cœur. Il est important de souligner que l'effet thérapeutique dépend non seulement de la quantité des gènes de la dystrophine livrée, mais aussi de l'état d'avancement de la maladie au moment du traitement. En effet, chez les patients âgés qui montrent une

perte importante de fibres musculaires, la livraison de la dystrophine aux cellules musculaires pourrait avoir un effet thérapeutique limité. En outre, un des problèmes importants reliés à la thérapie génique est le développement d'une réponse immunitaire vis-à-vis le gène thérapeutique appliqué. Pour surmonter ce problème, plusieurs groupes étudient actuellement la possibilité de livrer plutôt le gène de l'utrophine. Il s'agit d'un homologue de la dystrophine qui serait moins immunogène (Konieczny, Swiderski et Chamberlain, 2013).

Plusieurs moyens ont été explorés pour introduire le gène de cette protéine chez les patients dystrophiques via des procédures virales et non virales telles que la livraison d'ADNc de la dystrophine, le saut d'exon et l'utilisation des vecteurs viraux (Wang, Li et Xiao, 2000).

Les vecteurs viraux défectifs pour leur réplication dans le corps humain ont suscité un vif intérêt dans les thérapies de remplacement de gène pour la myopathie de Duchenne. Jusqu'à maintenant, le remplacement du gène défectueux à l'aide de virus adéno-associés (AAV) demeure une approche prometteuse pour une correction significative et à long terme (Kaplitt et al, 1994). En fait, l'AAV est non pathogène, reste stable dans les cellules musculaires et capable de s'intégrer dans le génome de l'hôte. Par contre, sa capacité d'encapsidation est limitée (5 kb) et ne permet pas l'insertion de gène codant pour la dystrophine (14 kb) (Wang, Li et Xiao, 2000). Pour contourner ce problème, une stratégie a été développée qui consiste à l'utilisation du gène de la mini-dystrophine. Puisque la dystrophine a une structure modulaire flexible, la délétion de certaines régions codantes non essentielles permet alors de réduire la taille du gène de la dystrophine tout en conservant ses fonctions importantes. Sur la base de ce principe, des études ont été menées afin de tester l'efficacité thérapeutique des particules d'AAV sur un modèle de souris mdx (modèle murin de la DMD). Cette étude a montré que six mois après l'injection de AAV dans les muscles des souris dystrophiques, une expression stable et efficace de la mini-dystrophine a été détectée dans la majorité des fibres musculaires. Ces

résultats appuient donc une approche thérapeutique qui pourrait être efficace chez l'homme (Wang, Li et Xiao, 2000).

Lors du premier essai clinique, une étude a démontré que l'injection des particules d'AAV recombinants contenant des transgènes codant pour la mini-dystrophine a rencontré des obstacles en rapport avec la réponse immunitaire. Ce paramètre est important à considérer pour les futures tentatives de restauration de l'expression de la dystrophine chez les patients atteints de la DMD (Mendell et al, 2010). Il s'agit notamment de déterminer le mode optimal de livraison des gènes, d'aborder les avantages et les inconvénients du remplacement de gène par rapport à la réparation des gènes existants et de surmonter les défis posés par la réponse immunitaire lors de la réintroduction d'un gène reconnu comme étranger par les patients atteints de la DMD.

2.1.4 Thérapie cellulaire

La stratégie de la thérapie cellulaire pour traiter la DMD a gagné une attention particulière ces dernières années. Cette approche consiste à greffer des myoblastes saines aux patients afin de réparer les fibres musculaires endommagées. Les cellules potentiellement thérapeutiques peuvent être obtenues soit à partir d'un patient ou d'un donneur sain. Dans le premier cas, les cellules sont corrigées *ex vivo* et par la suite réimplantées (transfert autologue). Dans le deuxième cas, les cellules saines sont injectées dans un patient dystrophique (transfert allogénique). Dans ce dernier cas, le donneur doit être compatible et l'on doit administrer des agents anti-rejet au patient, ce qui n'est pas sans effets secondaires.

Idéalement, les cellules transplantées devraient être en mesure de migrer du sang vers les muscles, capables de former des myotubes, d'entrer dans la niche des cellules satellites et s'auto-renouveler afin de fournir un traitement de longue durée (Konieczny, Swiderski et Chamberlain, 2013).

2.1.4.1 *Myoblastes et transplantation des cellules satellites*

Les cellules satellites des muscles, sont les cellules progénitrices principales du muscle squelettique, situées sous la lame basale. Ces cellules sont généralement quiescentes, mais sont activées lors d'une lésion musculaire. Les descendants de ces cellules satellites, appelées précurseurs myogéniques ou myoblastes, s'activent et se différencient en myoblastes. Par la suite, les myoblastes prolifèrent et fusionnent pour réparer ou remplacer les fibres endommagées. Une fraction des cellules satellites actives revient au repos pour maintenir une réserve de cellules progénitrices (Peault et al, 2007). En raison de la facilité d'isolement et de culture *in vitro* de ces cellules, les myoblastes ont été le premier choix de cellules thérapeutiques pour traiter la DMD.

Des tentatives de thérapies cellulaires ont été menées dans les années 1980 par Partridge et al. (Partridge et al, 1989). Dans le cadre de cette étude, il a été démontré que l'injection intramusculaire des myoblastes normaux dans les muscles de souris modèles de DMD, appelés souris MDX, a entraîné la fusion cellulaire et l'expression de la dystrophine dans les myofibres de ces souris.

Plusieurs travaux de recherche ont été consacrés afin de développer une stratégie de thérapie cellulaire efficace et durable. Parmi les travaux récents, on peut nommer un essai clinique de phase I qui a été élaboré par l'équipe de Jacques P. Tremblay du CHUQ-CHUL. Il s'agit d'une étude d'allogreffe de myoblastes saines dans les muscles des patients dystrophiques. Pour ce faire, des myoblastes obtenues à partir d'un parent sain compatible ont été transplantées dans 1 cm³ de muscle de neuf personnes dystrophiques âgées entre 8 et 17 ans. Ces patients ont été immunodéprimés avec le tacrolimus. Un mois après la transplantation, des biopsies musculaires de chaque patient ont été analysées. Les résultats obtenus ont révélé que l'expression de la dystrophine dans les sites greffés de cellules de huit patients a atteint environ 26% des fibres musculaires (Skuk et al, 2006; Skuk et al, 2004). Afin de tester si la transplantation des myoblastes chez les participants dystrophiques a été

réalisée avec succès, une réaction de polymérisation en chaîne par transcriptase inverse de l'ARN messager de la dystrophine de chaque participant a été effectuée. Dans le cadre de cette étude, il a été démontré que l'ARN messager de la dystrophine de ces participants était de type sauvage (Tremblay et al, 2009). Ceci prouve que la dystrophine correcte provient du donneur. Ces observations montrent bien que la transplantation des myoblastes a été réalisée avec succès. Cependant, ces résultats ont clairement démontré que la transplantation de myoblastes pourrait restaurer l'expression de la dystrophine normale dans un nombre limité de fibres musculaires. Pour améliorer ces résultats, une augmentation du nombre de myoblastes injectés pourrait être utile. Ceci nécessite une production de myoblastes fonctionnelles à grande échelle avant d'être transplanté chez les patients. Un des problèmes liés à la production des myoblastes est leur milieu de culture qui contient du FBS. D'ailleurs les organismes réglementaires vont interdire l'utilisation du FBS pour la culture de cellules thérapeutiques lorsqu'une alternative fonctionnelle est possible. Idéalement, les milieux de culture des cellules destinés à des usages thérapeutiques humains doivent être dépourvus de suppléments animaux non définis (van der Valk, 2004; Even, 2006). Le présent projet constitue une contribution à la résolution de cette problématique.

2.2 Les fluides biologiques

2.2.1 Origine du sérum foetal bovin (FBS)

Le sérum foetal bovin (FBS) est un fluide d'origine biologique obtenu à partir du sang. Initialement, les cellules sanguines sont séparées de la fraction liquide pour obtenir le plasma, ensuite les facteurs coagulants sont enlevés pour obtenir la fraction liquide qui correspond au sérum. Avant d'être commercialisé, le sérum subit plusieurs procédures de purification (Jochems et al, 2002) .

2.2.2 Composition globale du FBS

L'analyse approfondie du protéome constitue un axe de recherche très intéressant. En effet, le nombre des gènes identifiés codant pour des protéines

se situe entre 20000 et 25000 chez l'humain et ce nombre continue à augmenter (Perteau et Salzberg, 2010). Par ailleurs, le nombre de protéines qui constituent le protéome est beaucoup plus grand. En effet, si on suppose que la cellule contient 1000 gènes, chacun peut présenter vingt différentes formes glycosylées et dix variantes clivées. Le nombre des protéines obtenues est alors de 200 000 formes différentes.

D'ailleurs, le FBS est une source de plusieurs composants qui stimulent la croissance des cellules telles que les protéines, les facteurs de croissance, les hormones, les lipides et les minéraux. Il est estimé que jusqu'à 10 000 protéines peuvent être communément présentes dans le sérum (Adkins et al, 2002). Cependant, la distribution des protéines de sérum se trouve dans des proportions extrêmement déséquilibrées. En effet, les protéines hautement abondantes, d'abondance moyennes et faiblement abondantes représentent respectivement 90 %, 10 % et 1 % des protéines totales contenues dans le FBS (Righetti et Boschetti, 2013). À côté des protéines à haute abondance, telle que l'albumine qui représente à elle seule plus de 50 % des protéines totales du FBS, il existe d'autres polypeptides dont la concentration est extrêmement faible. Néanmoins, leur importance biologique n'est pas marginale. Au contraire, leur effet physiologique peut être important, même à une très faible concentration. Cette situation est une caractéristique relativement présente dans la plupart des fluides biologiques tels que le sérum, le plasma et les extraits cellulaires. La figure 1 illustre le large spectre de concentration du protéome du plasma humain qui s'étend sur 12 ordres de grandeur. En outre, une vue globale de la gamme de concentration dynamique des protéines sériques a été élégamment obtenue avec l'anticipation que, lors de l'utilisation de l'électrophorèse bidimensionnelle seulement, la résolution de la grande différence entre les protéines concentrées et les protéines diluées serait très problématique (Anderson et Anderson, 2002; Anderson et al, 2004; Righetti et al, 2003). Le défi consiste alors à accéder à ces espèces faiblement

abondantes et en conséquence, il est très difficile d'élaborer une étude de caractérisation satisfaisante.

Malgré la complexité du FBS, l'espoir de découvrir de nouvelles protéines actives, seules ou en synergie, stimule le développement de techniques qui en permettront l'analyse (ou plutôt la résolution). Dans le cas présent, c'est la recherche de facteurs du FBS stimulant la croissance de myoblastes fonctionnels qui motivera notre recherche de méthode de fractionnement permettant d'analyser l'effet de fractions plus simples du FBS.

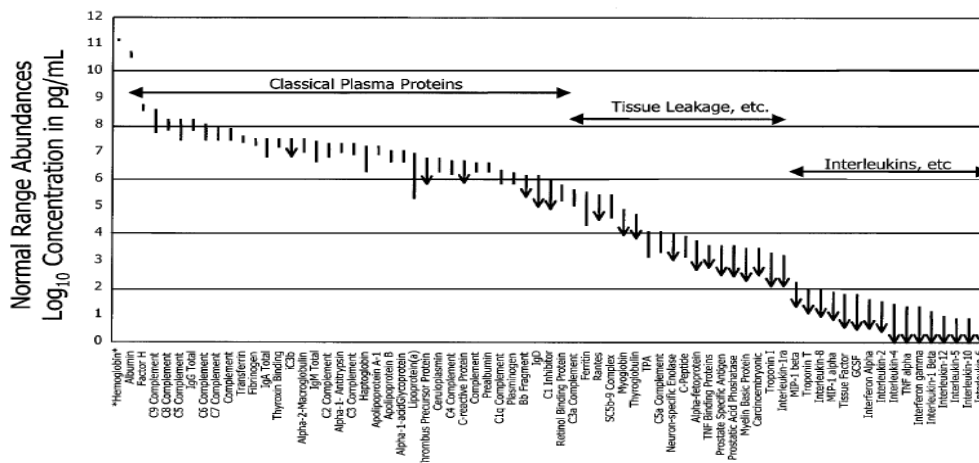


Figure 1 : Protéome du plasma humain (Anderson et Anderson, 2002).

2.2.3 Protéome et défis de leur élucidation

Plusieurs publications scientifiques soulignent les principales limitations des approches actuelles d'investigation du protéome. Prise séparément, chaque méthode pourrait facilement être considérée comme ineffective pour obtenir une vision globale et détaillée du protéome. En effet, certaines méthodes ne peuvent détecter que les espèces abondantes, alors que d'autres ne peuvent détecter que les petits polypeptides. Par exemple, les méthodes basées sur l'électrophorèse sur gel sont les plus couramment utilisées à ce jour. Cependant, ces méthodes ne sont pas appropriées pour les polypeptides de masses inférieures à 5 kDa, tandis que les méthodes de spectrométrie de

masse contribuent également à l'analyse des polypeptides de petites tailles. D'autre part, les polypeptides comprenant un grand nombre d'acides aminés hydrophobes ne peuvent pas être convenablement solubilisés et par conséquent, ne peuvent pas être analysés au moyen de méthodes non dénaturantes.

Les techniques analytiques présentement disponibles permettent d'analyser des molécules dans des gammes de concentration s'étendant seulement entre 3 et 5 ordres de grandeur, alors que la concentration dynamique des protéines dans un fluide complexe, comme le FBS, s'étend au-delà de ce nombre (Righetti et Boschetti, 2013). Tous ces faits soulignent la nécessité de développer des méthodes beaucoup plus sensibles et efficaces afin de parvenir à déchiffrer d'une manière approfondie et complète les espèces faiblement abondantes, qui constituent également des effecteurs potentiels de la croissance des myoblastes.

2.2.4 Rôle du FBS

Le sérum est un supplément utilisé souvent dans la culture cellulaire. Les principales fonctions des protéines du sérum dans le milieu de culture sont de fournir les facteurs hormonaux qui stimulent la croissance et la prolifération cellulaire, de fournir les protéines de transport qui assurent le transport des hormones, des minéraux, des oligo-éléments et des lipides. En outre, le sérum est une source riche de facteurs d'étalement, d'attachement (composants de la matrice extracellulaire) et de facteurs de stabilisation et de détoxification assurant des fonctions hémostatiques (maintien du pH) et des fonctions anti-protéasiques (inhibition des protéases) (van der Valk et al, 2004).

2.2.5 Les limites du sérum pour la culture cellulaire à usage thérapeutique

L'utilisation du FBS dans le milieu de culture est controversée, car il présente des problèmes éthiques et scientifiques. Par exemple, la collecte du sérum cause des souffrances inutiles pour les fœtus de veaux. En effet, après avoir

abattu des vaches gestantes, une aiguille est plongée dans le cœur du fœtus encore vivant, dont les battements permettent de prélever le sang sans effort. Cette ponction intracardiaque entraîne une mort lente par asphyxie. En ce qui concerne les problèmes scientifiques, le FBS est un fluide biologique non défini qui se caractérise par une grande variabilité inter-lots. Ceci conduit à un système de culture cellulaire difficilement prévisible dans lequel la croissance cellulaire et/ou les résultats expérimentaux peuvent varier de manière importante. En outre, l'inclusion de sérum d'origine animale en culture cellulaire pourrait être une source potentielle de contaminants, y compris les prions, les virus et les mycoplasmes (van der Valk et al, 2004).

La présence d'agents infectieux dans le FBS soulève également des questions relatives à la santé humaine, en particulier lorsque les produits finis sont destinés pour des usages thérapeutiques. Par conséquent, les patients sont confrontés à ces risques lors de la greffe des cellules produites dans des milieux de culture contenant du FBS. En raison de ces risques de santé, les autorités réglementaires découragent l'utilisation des milieux de culture qui contiennent les dérivés de produits animaux. Cette situation stimule le besoin de développer des milieux de culture chimiquement définis, sécuritaires et performants.

2.3 Le colostrum bovin

2.3.1 Qu'est-ce que le colostrum ?

Le colostrum bovin est la première sécrétion par les glandes mammaires de la vache après le vêlage (Tripathi et Vashishtha, 2006). Ce fluide, appelé aussi premier lait, est caractérisé comme un liquide visqueux et de couleur jaunâtre. Par définition, seulement la première traite s'appelle le colostrum. Sa composition est d'ailleurs différente de celle du lait, du fait qu'elle est plus riche en protéines, particulièrement en immunoglobulines (anticorps) (Thapa, 2005). La sécrétion de la 2ème à la 8ème traite (4ème jour de lactation) s'appelle le lait

de transition parce que sa composition devient graduellement semblable à celle du lait entier.

2.3.2 Composition globale

Le colostrum bovin est un fluide biologique riche en nutriments, immunoglobulines et molécules bioactives. Il constitue également une source riche en protéines, minéraux et vitamines, ainsi qu'en facteurs de croissance dont les plus abondants sont les facteurs de croissance épidermique (EGF) les facteurs de croissance ressemblant à l'insuline (IGF-I et II), les facteurs de croissance de transformation TGF- β 1 et β 2 (Playford, Macdonald et Johnson, 2000).

Le contenu protéique du colostrum peut se diviser en deux fractions, solubles et insolubles. La fraction soluble est représentée par les protéines sériques comme les immunoglobulines, β -lactoglobulines, α -lactalbumine et l'albumine. Tandis que la fraction insoluble est associée à la présence des caséines (Madureira et al, 2007).

2.3.3 Intérêts de l'utilisation de colostrum bovin pour la culture des cellules

Comme décrit précédemment, le FBS est l'additif le plus utilisé dans la formulation des milieux de culture pour stimuler la prolifération cellulaire. Cependant, il présente certains désavantages. Afin de résoudre cette problématique, d'autres fluides biologiques plus sécuritaires sont également disponibles et aptes au développement de milieux de culture cellulaire performants et sécuritaires.

Dans ce contexte, le colostrum bovin, par sa disponibilité, son faible coût et ses nombreux avantages, représente une alternative intéressante qui mérite d'être étudiée. En effet, l'utilisation du colostrum bovin comme supplément du milieu de culture cellulaire semble être exploitable dans la mesure où il est riche en éléments essentiels, particulièrement en molécules bioactives connues pour

leurs propriétés promotrices de la croissance et ses nombreux avantages, notamment sa grande disponibilité, sa facilité à être recueilli sans souffrance pour l'animal et potentiellement un risque moindre puisqu'il est destiné originalement à l'alimentation du veau. Il représente donc une alternative qui mérite d'être étudiée.

Donc, il pourrait être pertinent de tester le colostrum bovin ou une fraction du colostrum pour sa capacité à se substituer au FBS pour stimuler la croissance des cellules de mammifères. Par conséquent, la génération d'un produit actif pourrait constituer une alternative valable pour remplacer le sérum bovin dans le milieu de culture des cellules et pourrait contribuer à l'avancement de la recherche pour le développement des milieux de culture sans sérum.

Pour ce faire, une formulation de colostrum produit par la société Méthanature, dénommée LP1.5, nous a été fournie et a été testée.

2.4 Développement de milieux sans sérum pour la culture des myoblastes

Malgré l'avancement réalisé dans ce domaine, des progrès limités ont été accomplis dans l'élimination du sérum de milieu de culture des lignées cellulaires (Even, Sandusky et Barnard, 2006). Au meilleur de notre connaissance, aucun milieu sans sérum commercial ne permet l'expansion à grande échelle de myoblastes entièrement fonctionnelles.

Plusieurs travaux de recherche ont été consacrés au développement et la mise au point de milieux de culture définis sans sérum pour la production des cellules satellites humaines musculaires (HMSC). En 1988, Ham et ses collaborateurs ont développé un supplément défini de milieu de culture des myoblastes désigné SF (Ham et al, 1988), composé de cinq additifs, à savoir, l'EGF, l'insuline, la dexaméthasone, l'albumine de sérum bovin (BSA), et la fétuine (tableau 1). Ces additifs étaient ajoutés à un milieu de base qu'ils ont également

développé, le MCDB 120 (Molecular Cellular Developmental Biology Medium 120). La composition détaillée de ce milieu de MCDB120 ainsi que d'autres milieux de bases est décrite au tableau 3 (Ham et al, 1988). Dans le cadre de cette étude, les auteurs ont rapporté que le milieu MCDB120 auquel était ajouté le supplément SF était plus efficace pour la différenciation des cellules que pour la prolifération cellulaire. En outre, il a été observé que ce milieu supplémenté avec 5 % de FBS dialysé et de 0,5 % d'extrait d'embryon de poulet ou d'extrait pituitaire bovin permettait d'améliorer la croissance des HMSC en comparaison avec les cellules cultivées seulement avec le SF ou le FBS (Ham et al, 1988). De meilleurs résultats pouvaient aussi être obtenus en augmentant la concentration du FBS (non dialysé) à 15 %. C'est ainsi que le milieu standard avec sérum utilisé dans notre laboratoire, le MB1, fourni par le docteur Jacques P. Tremblay (CHUQ-CHUL), a été développé après quelques autres modifications des suppléments identifiés par Ham (tableau 2).

Tableau 1 : Composition du supplément SF développé par Ham (Ham et al, 1988)

Ingrédients	Concentration finale
MCDB 120	84 % v/v
BSA	0,5 mg/ml
Insuline	0,18 mg/ml
Dexaméthasone	0,39 pg/ml
EGF	10 ng/ml
Fétuine	0,5 mg/ml

Tableau 2: Composition du milieu MB1 avec sérum développé après modification des suppléments de Ham

Ingrédients	Concentration finale
MB1 ou MCDB120	85 % v/v
Dexamétasone	0,39 µg/ml
Insuline–Transferrine–Sélénium (ITS)	1% v/v

FGF-2	10 ng/ml
BSA	0,5 mg/ml
FBS	15 % v/v

Tableau 3: Composition des milieux de base

Milieux	Ham's F12	RPMI 1640	MCDB 120 ou MB1	RPMI/F12/MB1
Acides aminés (mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)
Glycine	7,50	10,00	2,25	6,58
L-Alanine	8,90		2,67	3,86
L-Alanine-L-Glutamine	217,00			72,33
L-Arginine		200,00		66,67
L-Arginine HCl	211,00		210,67	140,56
L-Asparagine	13,00	50,00		21,00
L-Asparagine e-H2O			15,01	5,00
L-Acide aspartique	13,30	20,00	13,31	15,54
L-Cystéine HCl-H2O			35,13	11,71
L-Cystine 2HCl	36,00	65,00		33,67
L-Acide glutamique	14,70	20,00	4,41	13,04
L-Glutamine		300,00	1461,50	587,17
Glutathion (réduit)		1,00		0,33
L-Histidine		15,00		5,00
L-Histidine HCL-H2O	21,00		41,93	20,98
L-Isoleucine	4,00	50,00	65,58	39,86
L-Leucine	13,10	50,00	131,17	64,76
L-Lysine				0,00
L-Lysine HCl	36,50	40,00	181,65	86,05
L-Méthionine	4,50	15,00	29,84	16,45
L-Phénylalanine	5,00	15,00	33,04	17,68
L-Proline	34,50	20,00	11,51	22,00
L-Sérine	10,50	30,00	31,53	24,01
L-Thréonine	11,90	20,00	35,73	22,54
L-Tryptophane	2,04	5,00	4,08	3,71
L-Tyrosine	5,40		18,12	7,84
L-Tyrosine sel dissodique dihydrate		29,00		9,67
L-Valine	11,70	20,00	117,15	49,62
Vitamines (mg/L)				
Biotine (vitamine B8)	0,007	0,020	0,00733	0,01154
Acide folique (Vitamine B9)	1,30	1,00		0,76667
Acide folique (5-formyl tetrahydrofolate-5H2O) (Ca salt)			0,60	0,20
Niacinamide (Vitamine B3)	0,04	1,00	6,11	2,38
Acide D-pantothénique (Hemi-Ca salt) (Vitamine B5)			23,82	7,94

D-pantothénate de calcium	0,50	0,25		0,25
Pyridoxine HCl (Vitamine B6)	0,06	1,00	2,06	1,04
Riboflavine (Vitamine B2)	0,04	0,20	0,00	0,08
Thiamine HCl	0,30	1,00	3,37	1,56
Cobalamine (Vitamine B12)	1,40	0,01	0,01	0,47
Chlorure de choline	14,0	3,0	13,96	10,32
i-Inositol	18,0	35,0	18,02	23,67
Acide para-aminobenzoïque		1,0		0,33
Sels (mg/L)				
Chlorure de calcium (CaCl ₂ ·2H ₂ O)	44,0		235,23	93,08
Nitrate de calcium (Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O)		100,0		33,33
Chlorure de magnésium (MgCl ₂ ·6H ₂ O)	122,0			40,67
Sulfate de magnésium (MgSO ₄ ·7H ₂ O)			246,38	82,13
Sulfate de magnésium (MgSO ₄) (anhydre)		48,8		16,28
Chlorure de potassium (KCl)	223,6	400,0	298,20	307,27
Bicarbonate de sodium (NaHCO ₃)	1176,0	2000,0	1176,00	1450,67
Chlorure de sodium (NaCl)	7599,0	6000,0	6430,00	6676,33
Phosphate de sodium dibasique (Na ₂ HPO ₄)	142,0	800,0		314,00
Phosphate de sodium dibasique (Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O)			134,04	44,68
Éléments trace (mg/L)				
Heptamolybdate d'ammonium * (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O			0,0037	0,0012
Métavanadate d'ammonium * (H ₂ NH ₄ VO ₃)			0,0006	0,0002
Sulfate de cuivre (CuSO ₄ ·5H ₂ O)	0,003		0,0025	0,0017
Sulfate de fer (FeSO ₄ ·7H ₂ O)	0,834		0,834	0,556
Sulfate de manganèse pentahydrate (MnSO ₄ ·5H ₂ O)			0,00024	0,00008
Chlorure de Nickel(II) hexahydrate (NiCl ₂ ·6H ₂ O)			0,00007	0,00002
Acide sélénieux (H ₂ SeO ₃)			0,00387	0,00129
Méta-silicate de sodium (Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O)			2,842	0,947
Sulfate de zinc heptahydraté (ZnSO ₄ ·7H ₂ O)			0,086	0,029
Autres (mg/L)				
Adénine			0,135	0,045
D-Glucose (Dextrose)	1802	2000	1000	1601
Hypoxanthine	4,0			1,33333
Rouge de phénol	1,2	5,0	1,242	2,481
Putrescine 2HCl	0,2		0,00016	0,05372
Pyruvate de sodium	110,0		110,04	73,35
Thymidine	0,7		0,024	0,241
Lipides (mg/L)				
Acide linoléique	0,1			0,028
Acide lipoïque	0,2			0,067

Jusqu'à présent, la production des myoblastes s'effectue en utilisant un milieu contenant du FBS. Le développement des milieux sans sérum nécessite du temps ainsi que beaucoup d'effort. Dans notre laboratoire, le Laboratoire d'Optimisation des Bioprocédés (LOB), un milieu sans sérum complètement défini, le LOBSFM, a été développé par Victor Parent (étudiant au Ph.D.). La formulation de ce milieu a été obtenue suite à une étude complexe des effets individuels ainsi que synergiques de 70 additifs et 6 milieux de base. Le milieu finalement obtenu est décrit au tableau 4. (Parent et al, 2009). Il s'agit, à notre connaissance, du seul milieu de culture sans sérum existant aussi efficace que le milieu standard qui permette la prolifération spécifique des myoblastes humaines. De plus, les myoblastes cultivées dans le milieu LOBSFM gardent la capacité à fusionner *in vitro*. Toutefois, ce milieu affecte la morphologie des cellules et ne permet une aussi bonne greffe sur des muscles de souris que des myoblastes proliférées en milieu standard contenant du FBS.

Tableau 4: Composition du milieu sans sérum, LOBSFM, développé dans notre laboratoire pour la culture des myoblastes

Ingrédients	Concentration stock	Concentration finale dans le milieu de culture
MB1	-	33 % v/v
F12	-	33 %v/v
RPMI	-	33 %v/v
ITS	100X	10 ml/L
Mélange de lipides	100X	10 ml/L
B27 sans Vit A	50X	20 ml/L
FGF-2	-	10 ng/mL
FGF-4	-	10 ng/mL
IGF-1	-	10 ng/mL
EGF	-	10 ng/mL

IL-1alpha	-	5 ng/L
IL-1beta	-	5 ng/L
Dexamétasone	-	0,39 mg/L
BSA	-	0,5 mg/mL
Fétuine	-	0,5 mg/mL
Glutamine	-	4 mM
Fibronectine	-	5 µg/mL

Malgré la richesse de la composition des milieux de culture sans sérum développés, il est clair que certaines composantes qui existent dans le sérum sont encore mal connues et pourraient avoir un rôle important pour assurer une production de myoblastes entièrement fonctionnelles. Ceci renforce l'importance d'explorer la composition du sérum foetal bovin afin d'identifier de nouveaux effecteurs potentiels d'où le but de ce présent projet.

2.5 Bioséparation des molécules biologiques

2.5.1 Généralités

L'ingénierie de la séparation des biomolécules a connu un progrès important au cours de cette dernière décennie, à la fois comme un sujet académique ainsi qu'au niveau industriel. En effet, la bioséparation joue un rôle important dans le développement des industries chimiques, pharmaceutiques et biotechnologiques.

Avant de discuter des processus par lesquels la bioséparation est effectuée, il peut être intéressant de discuter de certaines propriétés fondamentales des substances biologiques, en particulier celles qui sont pertinentes dans les processus de bioséparation.

2.5.2 Propriétés fondamentales des biomolécules

Les protéines sont des biomolécules sensibles à la dénaturation et autres formes de dégradation. Par conséquent, les techniques de bioséparation

devraient être douces, en termes de conditions physico-chimiques telles le pH, la force ionique et la température (R.Gosh et al, 2006).

D'autres paramètres physico-chimiques à considérer lors de l'étape de la bioséparation des biomolécules sont entre autres la taille, la masse moléculaire, la charge électrostatique, la solubilité et le coefficient de sédimentation.

La masse moléculaire, généralement exprimée en Dalton (Da) est utilisée en tant que paramètre de base dans les techniques de bioséparation telles que la chromatographie d'exclusion de taille et les séparations par membrane. La masse moléculaire d'une substance influe également sur d'autres propriétés telles que la sédimentation, la diffusivité et la mobilité dans un champ électrique. Par ailleurs, la charge électrostatique d'une protéine est un paramètre important à tenir en compte lors de la bioséparation. En effet, la charge d'un acide aminé dépend du pH de la solution. Pour les protéines qui sont constituées d'un grand nombre d'acides aminés, la situation est plus complexe. Dans ce cas, la charge électrostatique d'une protéine est une fonction complexe du pKa et du pKb individuels des résidus des acides aminés constitutifs qui la compose. Donc, il est crucial de bien cibler l'intérêt de chaque étape de séparation des protéines de sérum afin d'obtenir une séparation convenable.

Au cours de ce projet, nous avons proposé d'appliquer trois méthodes de bioséparation des protéines du FBS. La première est l'électrodialyse sur membrane d'ultrafiltration, une étape qui combine la séparation des biomolécules en fonctions de leur masse moléculaire et en fonction de leur charge, simultanément. La deuxième méthode de séparation choisie est une méthode affinitaire basée soit sur une librairie d'hexapeptides qui permet de concentrer les protéines de faibles abondances ou l'affinité du Cibacron bleu F3G-A pour l'albumine, qui se caractérise comme étant la protéine la plus abondante dans le sérum fœtal bovin. Le choix de ces méthodes de fractionnement du FBS est basé entre autres, sur la spécificité de chaque méthode pour la séparation des protéines du FBS, la facilité de l'application et le

faible coût. Ces techniques ont également été choisies pour compléter d'autres études similaires, portant sur d'autres techniques de séparation, faites au sein du laboratoire du Professeur Garnier.

2.5.3 Séparation par ultrafiltration

La technique d'ultrafiltration est maintenant largement utilisée pour le traitement des médicaments thérapeutiques, des enzymes, des hormones, des vaccins et des produits sanguins, en raison de son faible coût et la facilité de sa mise à l'échelle.

L'ultrafiltration est une technique qui permet de séparer les molécules grâce à une différence de masse et donc de taille. Cette technique permet de séparer des molécules de masse allant de 3 kDa à 500 kDa. La capacité d'une membrane d'ultrafiltration pour retenir des macromolécules est également exprimée en termes de taille nominale de seuil de passage moléculaire, MWCO. Les principaux domaines d'application de l'ultrafiltration sont énumérés ci-dessous :

- Concentration et dessalage de solutés
- Purification de solvants
- Fractionnement des macromolécules

Il faut cependant retenir que le MWCO est une valeur nominale et donc que la distribution de taille réelle des molécules retenues ou passant la membrane d'ultrafiltration est en fait différente de cette valeur. La forme que prendra la molécule, par exemple globulaire ou linéaire, aura également un impact sur son passage ou pas de la membrane. Finalement, on peut reconnaître deux modes de filtration, la filtration directe ou tangentielle. Dans le premier cas, la vitesse nette de la solution filtrée est perpendiculaire à la membrane filtrante, alors que dans le second cas on impose un mouvement tangentiel au fluide, par rapport à la membrane, ce qui a pour effet de réduire la vitesse d'accumulation du gâteau

et donc d'augmenter la capacité utile de la membrane, pour une surface de filtration donnée.

2.5.4 Ultrafiltration sur des cartouches centrifugeables

Les cartouches centrifugeables permettent une ultrafiltration simple de petits échantillons. Bien que la membrane soit montée verticalement dans le tube à centrifugé, ce type de filtration reste direct. En outre, ces filtres peuvent permettre la diafiltration ou le dessalage d'une solution. Le solvant et les petites molécules (tels les sels) passent à travers les pores de la membrane (perméat), tandis que les grosses molécules, dont la taille est plus grande que le MWCO de la membrane, sont retenues (rétentat). Le choix de taille de la membrane utilisé dépend de l'objectif de l'expérience à réaliser.

2.6 Électrodialyse sur membrane d'ultrafiltration (EDUF)

2.6.1 Généralités

L'électrodialyse avec membrane d'ultrafiltration (EDUF) est une nouvelle technique qui a été développée dans le laboratoire du Dr Laurent Bazinet (Université Laval). Cette technologie brevetée couple l'ultrafiltration tangentielle avec un champ de potentiel électrique afin de séparer les molécules en fonction à la fois de leur taille et de leur polarité (Amiot, 2005).

La portée de cette technologie s'étend sur plusieurs secteurs pour lesquels la séparation sélective des composés biologiques occupe un axe de recherche important telle que dans les domaines bio-alimentaire, bio-pharmaceutique, chimique et biotechnologique. D'ailleurs, cette technique, réalisée à une température ambiante, permet de séparer les biomolécules dans des conditions douces ce qui permet de préserver leur fonctionnalité. Ceci constitue un avantage par rapport aux méthodes de séparation classiques qui nécessitent souvent l'utilisation des solutions dénaturantes. En outre, l'EDUF se caractérise par son faible coût et sa facilité de mise à l'échelle.

2.6.2 Principe du procédé d'EDUF

L'électrodialyse avec membrane d'ultrafiltration est une technologie qui permet de séparer les molécules avec une très haute sélectivité. Cette technique combine la capacité de séparer les molécules à la fois selon leur charge et leur masse moléculaire. En effet, la séparation des molécules en fonction de leur charge est effectuée par l'application d'un champ électrique comme force motrice pour déplacer les molécules ioniques, alors que la séparation des molécules selon leur masse moléculaire est réalisée en fonction de la taille de pores de la membrane d'ultrafiltration utilisée (Bazinet, 2009).

La séparation par le procédé d'EDUF s'effectue dans une cellule d'électrodialyse dont le schéma est présenté à la figure 2. Ce système est constitué de trois compartiments. Durant toute la procédure de séparation, les solutions circulent dans chaque compartiment d'une manière continue soit, la solution d'alimentation qui contient les molécules d'intérêts à séparer, la solution de perméat où les molécules d'intérêts vont migrer et la solution d'électrode qui permet de fournir les ions requis pour le maintien du courant électrique ainsi que d'assurer le rinçage des électrodes. Ces solutions sont séparées par trois membranes: la membrane d'ultrafiltration, dont le MWCO sera choisi en fonction de la taille des molécules que l'on désire faire migrer dans le compartiment du perméat; et de part et d'autres de cette membrane, les membranes permettant aux petits anions (AMX) et cations (CMX) de passer vers les électrodes. Ces dernières membranes sont faites d'enchevêtrements de longues chaînes carbonées ramifiées formant des pseudo-nanocanaux qui permettent la migration des petits ions, mais pas des molécules d'intérêt.

Lors de l'application d'un champ électrique, les molécules chargées négativement et positivement sont attirées par l'anode et la cathode, respectivement, tandis que les molécules neutres restent immobiles. Par conséquent, la migration des ions peut déminéraliser les solutions au cours de la procédure. En outre, la migration des molécules dépend aussi de la taille des pores de la membrane d'ultrafiltration utilisée. Tous ces paramètres influencent

la séparation des biomolécules lorsqu'il s'agit de séparer des molécules d'une manière sélective, d'où la nécessité de bien étudier les propriétés des molécules d'intérêts à séparer.

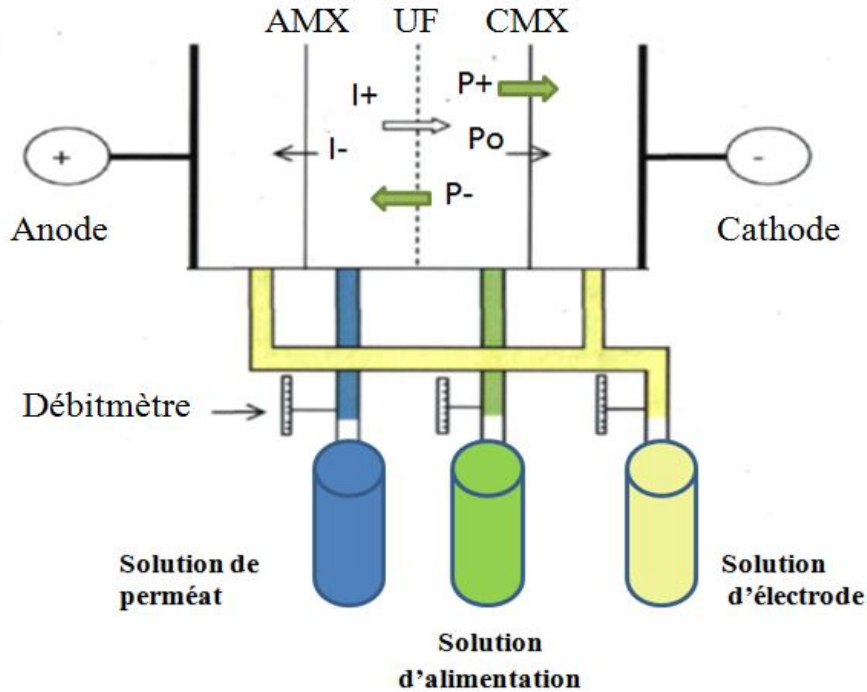


Figure 2: Configuration de la cellule d'EDUF pour le fractionnement de fluides biologiques. AMX : membrane anionique; UF : membrane d'ultrafiltration; CMX : membrane cationique, I^+ : cations, I^- : anions; P^+ : protéines chargées positivement; P^- : protéines chargées négativement; P^0 : protéines neutres (Bazinet et Firdaous, 2009).

2.6.3 Effet du pH des solutions

Le pH de la solution joue un rôle déterminant pour la séparation d'un mélange protéique avec la technique d'EDUF. La charge de la plupart des molécules biologiques est affectée par le pH de la solution qui les entoure. En effet, les protéines sont des molécules amphotères et donc l'amplitude et le signe de la charge d'une protéine peuvent être manipulés en modifiant le pH. Par conséquent, les protéines peuvent agir comme des acides, des bases ou rester neutres. C'est-à-dire, une protéine peut acquérir une ou plusieurs charges négatives par le résidu carboxylique des acides aminés qui la compose ou bien

une ou des charges positives via leurs résidus aminés. Par ailleurs, lorsque le pH de la solution est égal au point isoélectrique (pI) de la protéine, la charge globale nette de la protéine est nulle du fait qu'elle possède autant de charges négatives que de charges positives. Elle reste immobile sous l'effet d'un champ électrique. Plus la valeur de pH choisie est loin du pI, plus la protéine sera chargée et sa mobilité électrophorétique sera favorisée. En ce basant sur ce principe, nous avons choisi d'appliquer un pH 5, proche du pI de l'albumine bovine estimé à 4,9 approximativement (Mandal et al, 2012), afin de limiter sa migration dans le compartiment du perméat.

2.6.4 Rôle des membranes dans le système EDUF

La mobilité des protéines par la technique d'EDUF est inversement proportionnelle à leur taille. Par conséquent, la taille des pores des membranes utilisées est un paramètre important à considérer lors de la séparation des biomolécules. D'ailleurs, la membrane d'ultrafiltration dans le système d'EDUF est une membrane poreuse qui sert de barrière de migration sélective. D'où, la nécessité de bien choisir la taille des pores de la membrane afin d'assurer une migration des protéines d'intérêts d'une manière spécifique.

Les membranes échangeuses d'ions utilisées dans le système d'EDUF sont des membranes perméables aux ions. Il s'agit également des membranes anioniques sur lesquels sont fixés des groupements chargés positivement, et des membranes cationiques qui portent des groupements chargés négativement. Par conséquent, les molécules dont la charge est opposée à celle des groupements ionisés de la membrane sont attirées et peuvent traverser cette membrane. Tandis que les molécules ayant une même charge que les groupements ionisés de la membrane sont repoussées de la membrane.

2.7 Séparation par méthode affinitaire

Les méthodes affinitaires ont été le plus souvent utilisées pour faciliter la séparation des complexes protéiques, ainsi que pour la purification et la détection des protéines d'intérêts (Zhao, Li et Liang, 2013).

La liaison par affinité est basée sur la reconnaissance stéréo-spécifique entre les molécules cibles et les ligands, c'est à dire la forme du ligand est complémentaire à la forme de la molécule cible entière ou au moins une partie de la molécule. Après la reconnaissance, le ligand et la molécule cible sont maintenus assemblés par une combinaison de liaisons hydrogènes, d'interactions hydrophobes et de van der Waals. En outre, la liaison par affinité est si spécifique qu'elle peut être utilisée pour extraire une molécule particulière à partir d'un mélange de plusieurs différentes molécules. En effet, si un ligand se lie à un seul type de molécule, le processus de liaison est désigné comme une adsorption d'affinité spécifique. Mais, lorsqu'un ligand se lie à un éventail de molécules ayant certaines similitudes, le processus de liaison est désigné comme une adsorption d'affinité générale. Un adsorbant d'affinité est préparé en fixant le ligand d'affinité à un matériau de support insoluble également appelé la matrice de support. Des exemples de matériaux de support utilisés pour la préparation d'adsorbants d'affinité comprennent entre autres le dextrane, l'agarose et la cellulose. Les supports à base d'agarose sont les plus largement utilisés dans le processus d'adsorption par affinité. Il existe une grande variété de ligands d'affinité dont certains sont des antigènes, des anticorps, les protéines A et G, les analogues de substrats et les ligands à base de colorants.

2.7.1 Adsorbants pour lier l'albumine

Les ligands à base de colorants sont disponibles commercialement, peu coûteux, et peuvent aisément être immobilisés, en particulier sur des matrices portant des groupes hydroxyle. D'ailleurs, ces colorants sont tous de nature synthétique et sont classés en tant que ligands d'affinité, car ils interagissent avec les sites actifs de plusieurs protéines en imitant la structure de substrats, de cofacteurs ou d'agents de liaison pour les protéines (Denizli et Pişkin, 2001).

Parmi les ligands à base de colorants qui sont couramment utilisés dans la chromatographie d'affinité on peut nommer le Cibacron bleu. Il s'agit d'un

colorant à caractère ionique, hydrophobe et aromatique. Sa structure moléculaire est représentée à la figure 3. Plusieurs études ont rapporté que le ligand Cibacron F3G-A est connu pour son affinité pour l'albumine sérique (Tüzmen, Uzun et Denizli, 2007; Uzun et al, 2004) En outre, il est connu que le Cibacron Bleu F3G-A interagit spécifiquement et de manière réversible avec l'albumine par la combinaison des interactions hydrophobes, hydrogènes et électrostatiques (Kuralay et al, 2013).

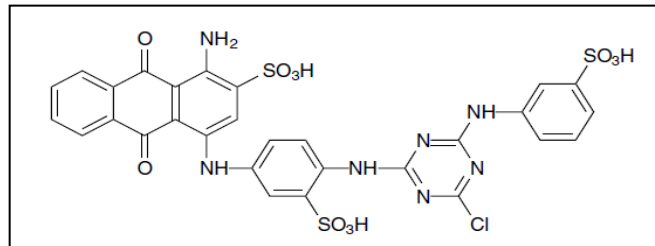


Figure 3: Structure moléculaire du ligand Cibacron bleu F3G-A (Odabaşı et Denizli, 2004).

2.8 Fractionnement par une librairie d'hexapeptides

La librairie de ligands d'hexapeptides nommée, ProteoMiner^{MD}, est une approche récemment développée en vue de détecter de nouvelles biomolécules d'intérêts, contribuant ainsi à la cartographie du protéome. Cette technologie a été appliquée à la recherche du protéome de faible abondance dans les différents fluides biologiques tels que l'urine, le sérum et le lysat plaquettaire, élargissant ainsi la connaissance et l'identification de nouvelles espèces faiblement abondantes.

La technique de fractionnement d'un fluide biologique par la librairie d'hexapeptides est basée sur l'interaction spécifique entre les biomolécules et une grande diversité d'hexapeptides liés à des supports chromatographiques. Ces supports chromatographiques sont des billes de structures poreuses, sur lesquelles la librairie de peptides est synthétisée selon l'approche de Merrifield

modifiée, en utilisant la méthode bien connue "séparer recombinaison assembler" (Boschetti et Giorgio Righetti, 2008; Robinson et Robinson, 2008). Ce procédé permet d'obtenir un mélange de billes où chacune comprend de multiples copies du même ligand peptidique. La concentration du ligand peptidique greffé à la bille peut atteindre environ 10 à 15 pmoles par bille et chaque bille a un ligand différent par rapport à l'autre bille. Le nombre de divers ligands dépend du nombre d'acides aminés utilisés ainsi que de la longueur de la chaîne peptidique.

La limitation intrinsèque de la capacité de liaison des ligands constitue un paramètre essentiel dans la technologie actuelle, permettant ainsi de concentrer les molécules faiblement abondantes tout en réduisant de manière concomitante la concentration d'espèces abondantes. Par conséquent, la plage dynamique de concentration des protéines diminue dans l'échantillon analysé.

Le processus entier de la technique de fractionnement d'un fluide biologique par une librairie d'hexapeptides est illustré à la figure 4. Initialement, l'échantillon biologique, constitué de diverses protéines à différentes concentrations, est mis en contact avec la librairie d'hexapeptides fixés sur des billes. Durant le contact, les protéines sont capturées par leurs ligands spécifiques jusqu'à ce que la saturation soit atteinte. Les protéines en excès, non liées aux ligands, sont éliminées lors de l'étape de lavage. En fait, les protéines présentes à une concentration élevée satureront rapidement leurs ligands spécifiques de sorte que la grande majorité de ces protéines ne se lient pas à la librairie et sont élués. En revanche, les protéines de faible abondance se concentrent sur leurs ligands spécifiques jusqu'à saturation qui dépend à la fois de leur concentration dans la solution de l'échantillon initial et le volume de chargement (Guerrier, Righetti et Boschetti, 2008a). Cependant, des études ont démontré que la liaison entre les protéines et leurs hexapeptides spécifiques forment des complexes qui peuvent être très stables, nécessitant parfois des conditions dures pour leur dissociation, comme une solution de chlorhydrate de guanidine 6 M ou une solution d'urée 8 M.

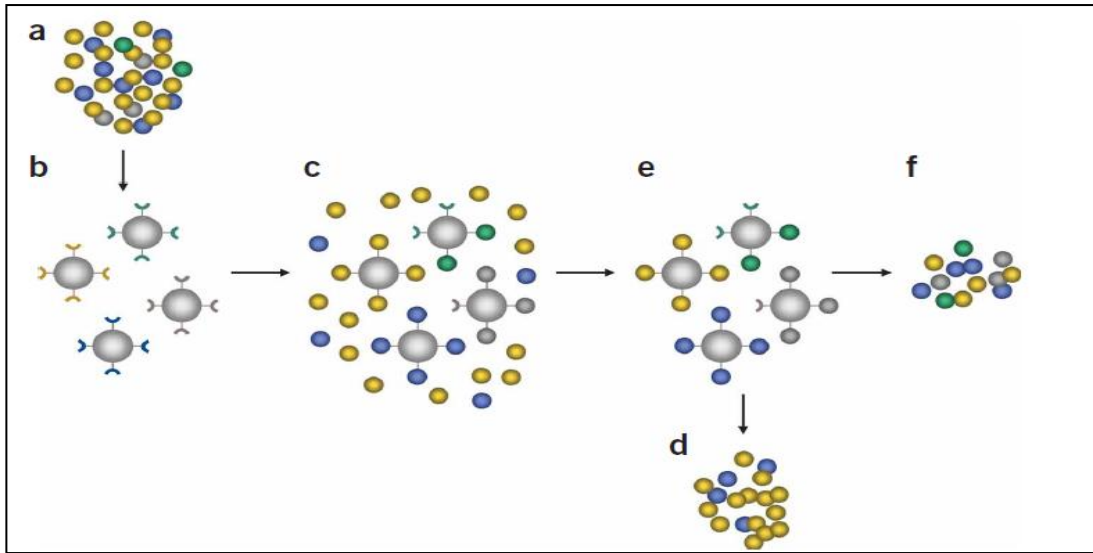


Figure 4: Représentation schématique du principe de fractionnement d'un fluide biologique par la technique de la librairie d'hexapeptides. (a) L'échantillon, comprenant ici 2 protéines, une de faible abondance (bleu) et une autre de plus forte abondance (jaune); (b) la librairie d'hexapeptides; (c) la mise en contact des protéines avec cette librairie; (e) le lavage permettant; (d) d'éliminer les protéines abondantes et (f) de libérer un mélange plus homogène des protéines fixées sur les billes (Guerrier, Righetti et Boschetti, 2008a).

Une étude récente a montré que le fractionnement d'un lysat de globules rouges par la librairie d'hexapeptides a permis une forte réduction d'une espèce dominante tout en amplifiant de façon concomitante les protéines de très faibles abondances (Boschetti et Giorgio Righetti, 2008).

Cette technologie pourrait être aussi intéressante pour identifier de nouvelles biomolécules effectrices potentielles à partir du sérum foetal bovin dans l'intention de réduire les protéines de grandes abondances notamment, l'albumine qui représente plus de 50 % de contenu protéique et camoufle les protéines moins abondantes et ainsi limite leur identification.

Chapitre 3. Matériel et Méthodes

3.1 Matériel

Item	Fournisseur	# de produit
Acide acétique, glacial	Fisher Scientific	UN2789
Acide chlorhydrique	BDH Reagents and chemicals	28507BF
Albumine de sérum bovin (BSA)	Sigma-Aldrich	A1933-25G
b-FGF humain	Feldan	1D-07-017b
B-mercapthoéthanol	Bioshop	MER002.100
Colostrom bovin	Métanature	LP1.5
Coomassie Fluor™ Orange protein gel stain	Molecular Probes, Life Technologies	C33250
COOMASSIE® BRILLIANT BLUE R-250 Ultra Pure	Bioshop	CBB250.25
Dexaméthasone	Sigma-Aldrich	D88-93
Diméthylsulfoxyde (DMSO)	Sigma-Aldrich	D2438
Dodécylsulfate de sodium (SDS)	Bioshop	SDS001.100
Érythrosine B	Sigma-Aldrich	E7505
Electrophoresis Purity Reagent Bromophenol Blue	BIO-RAD	161-0404
Glycérol	Bioshop	GLY001.1
Glycine	Bioshop	GLN001.1
Hydroxyde de Sodium 1.0 N	Laboratoire MAT	SS-0101
Mélange d'insuline de transferrine et de sélénite	GIBCO, Life Technologies	41400
Myoblastes	Jacques P. Tremblay, CHUQ/CHUL	BB 13 Mois
Méthanol, grade LC-MS	EMD-Millipore	MX0486-1
Novex® 4-20% Tris-Glycine Express Kit 1.0 mm, 15 well	Life Technologies	EC60255BX5

Page Ruler Unstained Protein ladder	Thermo Scientific	PI-26614
Quick Start Bradford	BIO-RAD	500-0205
Solution standard de BSA (2g/ml)	BIO-RAD	
Sérum foetal bovin (FBS)	Hyclone	SH 30396.03
Tampon phosphate (PBS 1X)	GIBCO, Life Technologies	10010-023
TripLE-Express (1X)	Life Technologies	15050-065
Tris	Life Technologies	15504-020

3.2 Équipements

Item	Fournisseur	# de catalogue
Enceinte de confinement biologique	Bio-Klone	BK-2-6
Centrifugeuse	Heraeus Instruments	Labofuge 400
Incubateur	REVCO	RCO3000 TABA
Microscope	Olympus	IX 50
Microscope	Olympus	IX 81
Bain-marie	VWR Scientifics Products	1203
Hémacymètre	VWR Scientific Barnstead	1570-208
Lecteur de plaques multi-puits (UV-Visible) Longueur d'ondes : 630 nm	Bio-Tek Instruments	EL808
Imageur (Image Quant)	GE Healthcare	Las 4000

Module d'électrophorèse (chambre de migration)	Life technologies	EI0001
MiVac Concentrator	Genevac Inc	DUP-12060-C00
Vari-Mix™ Platform Rocker (Agitateur)	Thermo Scientific	Apx 401
Barnstead Easypure II	Thermo Scientific	D7031
Pompe péristaltique	Masterflex	77202-50
Détecteur d'absorption UV	Shimadzu	SPD-6A
Colonne Hitrap Blue High Performance Volume de la colonne : 5 ml	GE Healthcare	17-0412-01
Librairies d'hexapeptides Kit ProteoMiner Volume de la colonne : 2 ml	Bio-Rad	1633012
Cartouches d'ultrafiltration centrifugeables MWCO : 3 kDa	Millipore	UFC900308

3.3 Protocoles expérimentaux

3.3.1 Décongélation des cellules

- Sortir le tube cryogénique contenant les cellules de l'azote liquide
- Décongeler les cellules en roulant l'ampoule dans les mains ou bien en la plaçant dans un bain-marie à 37 °C
- Transférer stérilement les cellules dans un tube contenant 4 ml de milieu de culture standard (contenant du FBS). La composition détaillée de ce milieu de culture est décrite au tableau 2
- Centrifuger pendant 5 minutes à 117 g
- Suspendre le culot dans un volume de milieu de culture standard
- Faire un compte
- Transférer les cellules à la densité cellulaire désirée dans un T-Flask de 25 cm² contenant 5 ml du milieu de culture

3.3.2 Culture cellulaire

- Inoculer les cellules dans un T-Flask de 25 ou de 75 cm² contenant 5 ou 15 ml du milieu sélectionné, respectivement, à la densité cellulaire désirée (ordinairement 20 000 cellules/ml)
- Incuber les cellules à 37 °C, 5 % de CO₂ dans un incubateur humidifié
- Changer le milieu stérilement sous la hotte deux fois par semaine
- Observer la croissance et la morphologie cellulaires au microscope (Olympus, IX50, 10X)
- Faire un passage cellulaire lorsque la confluence cellulaire atteint 80 %

3.3.3 Passage cellulaire

- Retirer stérilement le milieu utilisé du T-Flask
- Rincer les cellules avec un tampon phosphate sans calcium ni magnésium (PBS) avec un volume d'environ de 0,08 ml/cm²
- Ajouter 0,04 ml/cm² de solution de trypsine (1X)
- Incuber 1 à 2 minutes à 37 °C
- Vérifier sous microscope le détachement cellulaire

- Neutraliser l'effet de la trypsine en ajoutant du milieu de culture avec sérum ou bien avec du milieu de culture avec anti-trypsine
- Centrifuger à 117 g pendant 5 minutes
- Enlever le surnageant et suspendre le culot dans le milieu de culture
- Prélever un échantillon pour faire un compte cellulaire
- Ensemencer la suspension cellulaire dans le milieu de culture à la densité désirée

3.3.4 Compte cellulaire à l'hémacymètre

- Prendre un échantillon de suspension cellulaire dans un tube Eppendorf
- Faire une dilution $\frac{1}{2}$ avec une solution d'érythrosine B (1mg / ml)
- Remplir les deux chambres de l'hémacymètre avec l'échantillon par capillarité
- Compter le nombre total de cellules ainsi que les cellules rouges (mortes) dans les quatre sections de coin de chaque chambre sous le microscope
- Faire la moyenne de tous les comptes puis multiplier par le facteur de dilution avec l'érythrosine B et par le volume des chambres de l'hémacymètre ($1/10000$ ou 10^{-4} ml) :

*Concentration cellulaire (cellules/ml) = (compte/section) * facteur de dilution / volume des chambres de l'hémacymètre (10^{-4})*

Ratio d'expansion = Concentration cellulaire au jour j / Concentration cellulaire au jour 0

3.3.5 Congélation des cellules

- Centrifuger la suspension cellulaire pendant 5 minutes à 117 g
- Retirer le surnageant
- Suspendre le culot dans un tube contenant du milieu de culture + 10 % DMSO, à une densité cellulaire $3 \cdot 10^6$ cellules/ml
- Placer le tube sur la glace
- Transférer dans chaque 1 ml de la suspension cellulaire dans une ampoule cryogénique stérile

- Congeler les ampoules une nuit à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ puis les transférer dans l'azote liquide

3.3.6 Dosage de protéines par Bradford

- Préparer 5 solutions étalons à 0,05, 0,10, 0,15, 0,20 et 0,25 g/L d'albumine bovine sérique (BSA)
- Diluer les échantillons afin que leur concentration en protéine tombe dans la plage 0,05 à 0,25 g/L
- Déposer 10 μl de chaque échantillon à doser en triplicata ainsi que les solutions standard dans une plaque de 96 puits
- Ajouter 200 μl de réactif Bradford, dilué 1/5, par puits
- Incuber 15 minutes à température pièce
- Lire l'absorbance à 596 nm
- Calculer les concentrations en protéines des échantillons à l'aide de la régression linéaire sur les étalons

3.3.7 Électrophorèse sur gel (SDS-PAGE)

L'analyse des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) dans des conditions dénaturantes a été réalisée selon la méthode suivante :

- Préparer les échantillons de protéines à une concentration d'environ 1,25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
- Préparer 1 litre de la solution de migration 1X (tableau 5)
- Mélanger dans des tubes Eppendorf 12 μl d'échantillons de protéines avec 6 μl de tampon de dépôt (tableau 6)
- Chauffer les échantillons 5 min à $80\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Centrifuger les tubes
- Mettre le gel dans la chambre de migration
- Remplir le module d'électrophorèse avec 800 ml de la solution de migration 1X
- Déposer 5 μl de l'échelle standard de masses moléculaires dans le premier puits et 18 μl d'échantillons dilués dans chaque autre puits

- Brancher le module d'électrophorèse au bloc d'alimentation électrique à 125 volts et laisser migrer environ 90 min
- Colorer le gel avec une solution Coomassie Fluor™ Orange Protein Gel Stain pendant 1 heure
- Décolorer le gel avec de l'eau ultra-pure pendant 1 heure
- Prendre une image du gel avec l'imageur (Image Quant)

Tableau 5 : Composition du tampon de migration Tris-glycine10X

Composition	Masse / volume
Tris-Base	30,2 g
Glycine	144 g
SDS	10 g
H ₂ O	1litre

Tableau 6 : Composition du tampon de dépôt des protéines

Composition	Masse /volume
1 M Tris –HCl pH 6.8	2,4 ml
SDS	0,8 g
Bleu de bromophénol	4 mg
Glycérol	4 ml
H ₂ O	3,1 ml
B-mercapthoéthanol	0,5 ml

Remarque : le B-mercapthoéthanol est rajouté au moment de la préparation des échantillons

3.3.8 Identification des protéines par spectroscopie de masse LC-MS-MS

- Colorer le gel 5 min avec une solution Bleu de Coomassie sous agitation
- Rincer le gel avec de l'eau purifiée quelques secondes
- Décolorer le gel avec une solution de décoloration (40 % méthanol, 10% acide acétique glacial et 50% eau purifiée)
- Changer la solution 4 fois chaque 20 min sous agitation
- Laisser décolorer pendant une nuit dans de l'eau purifiée

- Après décoloration du gel SDS-PAGE, identifier les bandes à analyser
- Couper soigneusement les bandes d'intérêt avec un scalpel stérile
- Nettoyer bien le scalpel lors d'un passage d'une bande à une autre
- Déposer chaque bande dans un tube Eppendorf contenant 100 µl d'eau purifiée
- Envoyer ces échantillons à la Plate-Forme Protéomique (PFP) du Centre de génomique de Québec
- Le PFP prend en charge la digestion tryptique des bandes et l'analyse des protéines avec un Triple TOF 5600 + de AB SCIEX. Un rapport d'analyse lisible avec le visualisateur Scaffold de Proteome Software Inc est généré

3.3.9 Effet de différentes fractions du FBS sur la croissance cellulaire

Ces essais se font dans des plaques de 24 puits en duplicata. Chaque puits est initialement inoculé à 20 000 cellules/ml dans 500 µl du milieu de culture à tester. Un suivi de la croissance cellulaire est ensuite effectué durant une semaine en faisant des comptes cellulaires aux jours 3, 5 et 7. Un changement de milieu de culture est effectué au jour 4.

3.3.10 Suivi de la morphologie cellulaire

Un suivi de la morphologie cellulaire est effectué avant chaque compte cellulaire en prenant des photographies en contraste de phase au microscope (Olympus, IX81, 20X)

Les démarches suivies pour prendre les photographies sont :

- Allumer l'ordinateur, le microscope et la caméra
- Placer la plaque à analyser sur la platine et s'assurer qu'elle est bien fixée
- Vérifier que les oculaires sont ajustés à la vue
- Ouvrir le logiciel d'acquisition des images «Métamorph Advanced»
- Choisir le grossissement désiré 4X, 10 X ou 20 X
- Appuyer sur l'icône «App», puis «Multi Dimensional Acquisition». Une fenêtre va apparaître

- Dans la fenêtre apparue, appuyer sur l'icône «Saving», puis «Select Directory» et ouvrir un nouveau fichier pour sauvegarder les images
- Nommer l'expérience réalisée dans le champ «Base name»
- Appuyer sur l'icône «Stage» puis appuyer sur «Load» et sélectionner le puits d'intérêt. Toutes les positions d'images à prendre seraient affichées. Cliquer deux fois sur la position centrale. Par exemple, pour une prise de 25 images pour le puits #1, la position #13 correspond à la position centrale dont les coordonnées X et Y = 0
- L'icône «Live» permet de voir l'image de la condition à tester en temps réel via la caméra. Régler le focus de l'image en balayant des valeurs de Z jusqu'à trouver une netteté maximale
- Appuyer sur l'icône «Device», «Focus» puis «Set origin»
- Appuyer enfin sur «Acquire» pour commencer l'acquisition des images pour le puits sélectionné

3.3.11 Détermination de la teneur en matière sèche

- Peser 10 tubes Eppendorf vides
- Remplir 5 tubes avec 2 ml échantillon chacun et peser
- Sécher les tubes 12 h au Speed-Vac à 80 °C
- Peser les tubes après 6 h et 12 h de séchage
- Calculer la concentration en matière sèche en faisant la différence entre la masse de l'échantillon hydraté et la masse de l'échantillon séché

3.3.12 Fractionnement/concentration du fluide biologique FBS

3.3.12.1 *Fractionnement du FBS par un procédé d'Électrodialyse avec membrane d'ultrafiltration (EDUF)*

a) Configuration de la cellule

La cellule d'EDUF utilisée était de type MicroFlow (Electrocell AB, Taby, Sweden), de surface effective de 10 cm² (voir figure 2 pour un schéma du système). Les membranes utilisées étaient une membrane anionique AMX-SB (Tokuyama Soda Ltd), une membrane cationique CMX-SB (Tokuyama Soda

Ltd) et une membrane d'ultrafiltration (UF) en polyéthersulfone de taille de pore de 0,1 μm (GE Healthcare).

La cellule d'EDUF était constituée de trois compartiments où trois solutions différentes circulaient : la solution mère à fractionner, la solution de perméat et la solution d'électrolyte. Chaque compartiment était connecté à un réservoir pour permettre la recirculation continue des solutions. Les solutions étaient recirculées en utilisant des pompes centrifuges (Iwaki Co. LTD, Tokyo, Japon) et les débits étaient contrôlés en utilisant des rotamètres (Gilmont Instrument Co, Barrington, IT USA). Le voltage appliqué entre les deux électrodes provenait d'un générateur de puissance (modèle HPD 30-10 SX, Xantrex, Burnaby, BC, Canada). Des pH-mètres (modèle SP20, Thermo Orion, West Chester, PA, USA) ont été utilisés pour contrôler le pH des solutions de perméat et de FBS durant toute la procédure. Aussi, des conductimètres (modèle 3100, Yellow Spring Instrument Co., Yellow Springs, OH, USA) ont été utilisés afin de suivre l'évolution de la conductivité des solutions au cours de l'expérience.

b) Conditions opératoires de l'EDUF

400 ml d'une solution diluée de FBS à 4 g/L de protéine environ (équivalent à une dilution de 1/10) dans l'eau ont été fractionnés par la procédure d'EDUF durant 4 heures de traitement. Les compartiments d'électrodes et de perméat contenaient respectivement 900 ml d'une solution de Na_2SO_4 , 20 g/L et 400 ml d'une solution KCl, 2 g/L. Les débits de recirculation des solutions d'électrode et de perméat étaient de 650 ml/min et 200 ml/min, respectivement. Le débit de la solution de FBS était de 180 ml/min. Une tension de 18 volts a été appliquée et a été maintenue constante tout au long de l'expérience. La conductivité de la solution du FBS a été ajustée à une valeur proche de la conductivité de la solution de perméat au début de l'expérience avec du KCL. Les pH de la solution du perméat et du FBS ont été ajustés au début de l'expérience moyennant une solution de HCL 1M. Néanmoins, le pH de ces deux solutions

était également contrôlé durant toute d'expérience afin de le maintenir constant en utilisant des solutions de HCL (1M) ou NaOH (1M). Cette expérience a été réalisée à un pH 5, une valeur proche du point isoélectrique de l'albumine bovine (BSA) qui est estimé à 4,9 approximativement (Mandal et al, 2012). Théoriquement, à une valeur de pH 5, la charge globale nette de la BSA devrait être nulle et la molécule devrait rester immobile sous un champ électrique.

3.3.12.2 *Fractionnement par affinité sur une librairie d'hexapeptides (Kit ProteoMiner^{MD})*

- Les échantillons du FBS ont été fractionnés avec le kit de ProteoMiner (Bio-Rad). La procédure expérimentale suivie pour traiter les échantillons du FBS est la suivante :
- Brancher les tubes contenant un volume de 2 ml des billes de ProteoMiner^{MD} sur le système de filtration (Phenomenex)
- Rincer les billes 6 fois avec 10 ml d'eau ultrapure sous agitation pour éliminer l'éthanol
- Rincer les billes 2 fois avec 10 ml d'une solution PBS pH 7,4 sous agitation
- Remplir chaque tube avec le volume du FBS à traiter
- Laisser les échantillons du FBS en contact avec les billes de ProteoMiner^{MD} toute une nuit (16 h environ) à 4°C et sous agitation
- Récupérer les protéines non-retenues (flow through, fraction non attachée aux billes)
- Effectuer 4 lavages avec 5 ml PBS (pH 7,4). Récupérer chaque lavage dans un tube séparé
- Éluer les protéines accrochées sur les billes avec 2,5 ml d'une solution d'urée 8 M contenant également 5% d'acide acétique
- À la fin de la procédure, rincer les billes 1 fois avec 5 ml PBS pH 7,4 et 2 fois avec 5 ml d'eau ultrapure
- Entreposer les billes dans 3 ml d'une solution 20 % éthanol

3.3.12.3 Fractionnement du FBS par chromatographie d'affinité

Les échantillons du FBS ont été fractionnés sur une colonne d'affinité Hitrap Blue High Performance (HP) de volume 5 ml (# Cat. 17-0412-01, GE Healthcare). (Les caractéristiques de la colonne sont décrites dans l'annexe 7.4)

Le protocole réalisé est le suivant :

- Préparer un tampon de liaison KH_2PO_4 50 mM, pH 7 et un tampon d'éluant KH_2PO_4 50 mM, 1,5 M KCl, pH 7
- Filtrer chaque solution
- Faire le montage de la colonne. Brancher la colonne d'une côté à une pompe péristaltique et de l'autre côté à un détecteur d'absorption UV couplé à un ordinateur contenant un logiciel d'acquisition de données.
- Équilibrer la colonne avec le tampon de liaison KH_2PO_4 50 mM, 5 volumes de colonnes minimum
- Faire le zéro, une fois la valeur de l'absorbance stabilisée
- Définir les conditions de travail : le débit et le volume d'échantillon à déposer
- Injecter l'échantillon et démarrer l'enregistrement des données
- Commencer à collecter les fractions non retenues (flow through) lorsque la valeur de l'absorbance D_{0280} commence à augmenter
- Changer le tampon de liaison par l'éluant lorsque la valeur de l'absorbance revient à l'état initial
- Dès que la valeur de l'absorbance commence à augmenter, collecter la fraction éluée
- À la fin de la procédure, rééquilibrer la colonne avec le tampon de liaison, 5 volumes de colonnes minimum
- Rincer la colonne avec une solution de stockage 20 % éthanol, 0,1 M KH_2PO_4
- La régénération de la colonne est réalisée selon la procédure suivante :
 - Rincer 3 fois la colonne avec 20-25 ml d'une solution 0,1 M Tris HCl, 0,5 M NaCl pH 8,5

- Rincer 3 fois la colonne avec 20-25 ml d'une solution 0,1 M acétate de potassium, 0,5 M NaCl pH 4,5
- Effectuer le rinçage en alternance, une fois avec la solution basique et une fois avec la solution acide
- Rééquilibrer la colonne avec 50 ml de tampon de liaison

3.3.12.4 Fractionnement du FBS et du colostrum LP1.5 par des modules d'ultrafiltration centrifugeables

Les échantillons du FBS ainsi que du colostrum LP1.5 ont été fractionnés/concentrés par ultrafiltration à 3 kDa dans des modules de filtration. 15 ml de l'échantillon étaient placés dans le compartiment supérieur de ces filtres et centrifugés à 275 g durant 50 minutes.

Chapitre 4. Résultats et Discussion

4.1 Fractionnement du FBS par le procédé d'électrodialyse avec membrane d'ultrafiltration

Une expérience de fractionnement du FBS par EDUF a été réalisée. Les résultats de cette expérience sont décrits ci-dessous.

4.1.1 Mesure de la conductivité

Durant l'expérience de fractionnement du FBS par le procédé d'EDUF, un suivi de l'évolution de la conductivité des solutions du perméat et du FBS au cours du temps a été réalisé. La figure 5 illustre cette évolution. Il est clair que la conductivité de ces deux solutions a diminué au cours du temps. Au début de l'expérience, la conductivité de la solution du perméat était de 4,22 mS/cm et est passée à 2,6 mS/cm à la fin du traitement, correspondant à une déminéralisation d'environ 39 %. Pour la solution du FBS, la valeur initiale de conductivité ajustée était de 4,35 mS/cm. Cette valeur a diminué jusqu'à 1,76 mS/cm ce qui correspond à une déminéralisation de 60 % approximativement. La déminéralisation de la solution du perméat pourrait être expliquée par la migration des ions K^+ et Cl^- vers la solution d'électrode et la solution du FBS, respectivement. Alors que pour la solution du FBS, la déminéralisation pourrait être le résultat de la migration des molécules chargées négativement vers le perméat et la migration des cations vers la solution d'électrode. Globalement, la déminéralisation de ces deux compartiments signifie un mouvement net des ions vers les compartiments de solution d'électrodes (figure 2).

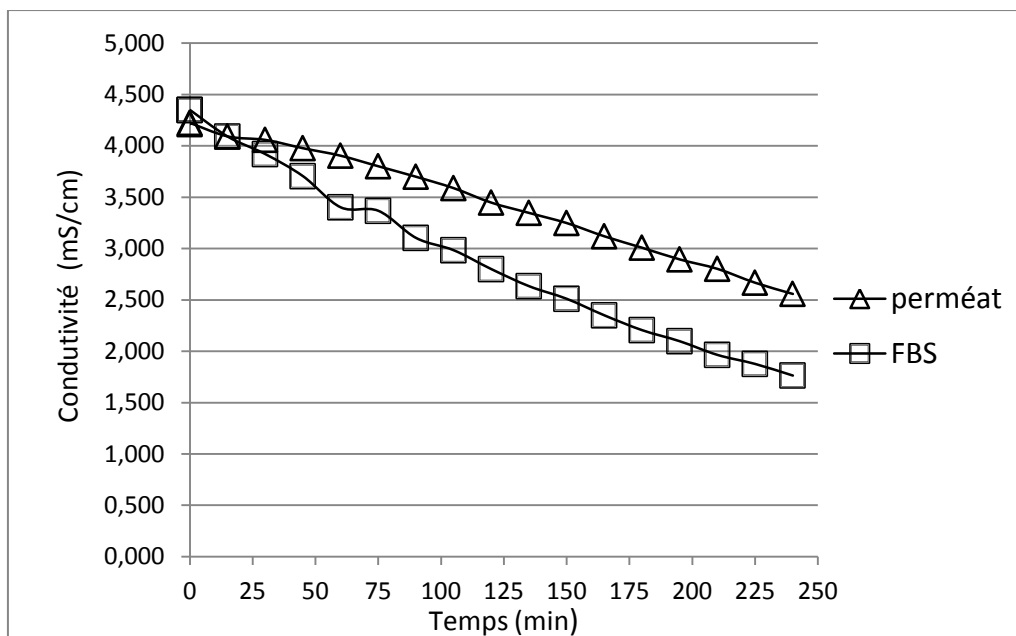


Figure 5: Évolution de la conductivité de la solution de perméat et de la solution du FBS en fonction du temps durant le procédé d'EDUF.

4.1.2 Migration totale des protéines

La figure 6 présente le profil d'évolution des concentrations de protéines totales dans les compartiments du perméat et du FBS. On remarque que la migration des protéines dans le compartiment du perméat n'a été détectée qu'après un délai de 1 heure. À partir de ce moment, une linéarité de la migration des protéines a été observée jusqu'à la fin de la procédure. Cependant, ce comportement n'est pas confirmé par ce qui a été observé dans le compartiment du FBS. En effet, dans ce dernier, une chute de concentration protéique n'a été observée que durant la première heure de traitement. De plus, la variation de concentration de protéines dans ces deux compartiments ne concorde pas puisqu'elle est de $-500 \mu\text{g/ml}$ dans le compartiment du FBS, tandis qu'elle n'est que de $+50 \mu\text{g/ml}$ dans le compartiment du perméat. Cette variation de concentration en protéines dans les deux compartiments ne peut être expliquée par une différence de volume entre les compartiments puisqu'ils sont tous deux de 400 ml, ni par une migration de fuite dans les compartiments d'électrolytes, puisque les membranes échangeuses d'ions ne l'auraient pas permis. Cependant, on peut penser que la membrane d'ultrafiltration, et possiblement

les membranes échangeuses d'ions, aient adsorbé une partie des protéines. Dans tous les cas, le compartiment du FBS a été appauvri en protéines, à un niveau de 14%, alors que celui d'élution a reçu 1,34% des protéines sériques. Donc, bien qu'une partie des protéines aient été perdues, il peut être utile de tester ces fractions pour leur capacité à supporter la croissance des myoblastes. Les fractions d'EDUF ont été testées en croissance de myoblastes. Cependant, aucun effet positif sur la prolifération des myoblastes n'a été observé.

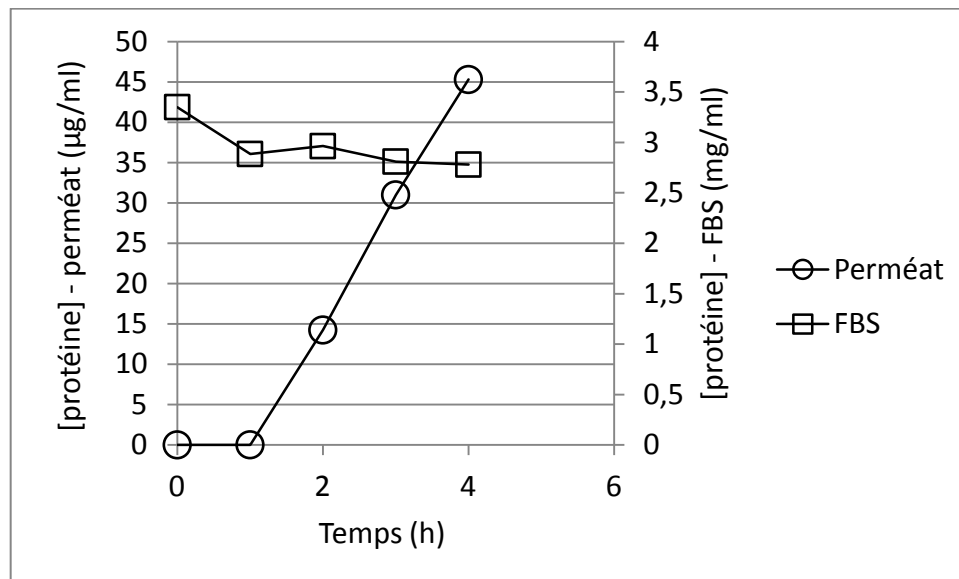


Figure 6: Évolution de la concentration en protéines dans les compartiments du perméat et du FBS.

4.1.3 Gel d'électrophorèse des fractions d'EDUF

La figure 7 présente le gel d'électrophorèse réalisé à partir des échantillons prélevés durant l'expérience dans le compartiment du perméat. Cette figure indique une évolution du profil protéique dans ce compartiment en fonction du temps de traitement ainsi qu'une différence de composition marquée entre ce compartiment (piste 5, 6 et 7) et le FBS (piste 2). En particulier, on observe dans le compartiment du FBS la présence d'une protéine de haute abondance, à une masse moléculaire approximative de 80 kDa et qui n'a pas migré dans le compartiment du perméat durant la procédure d'EDUF. Tandis que dans le compartiment du perméat, on remarque la migration des protéines de masses

moléculaires approximatives de 10, 45, 52 et 150 kDa. Cette différence démontre la sélectivité de migration des protéines du FBS dans un système EDUF. On remarque une évolution de la quantité de protéines entre les pistes 3 et 5, ce qui indiquerait que la migration des protéines a principalement eu lieu durant les 2 premières heures de la séparation. Cette constatation est à comparer avec les résultats contradictoires obtenus dans la mesure de l'évolution des protéines totales dans les deux compartiments et semble indiquer un bon compromis. Par ailleurs, la présence de BSA dans le compartiment de perméat contredit la prédiction. En effet, avec un point isoélectrique de 4,9 approximativement (Mandal et al, 2012), dans une solution de pH 5, il était prévu que la migration de la BSA vers ce compartiment serait négligeable.

Cette migration pourrait être expliquée soit 1) par l'association de la BSA avec d'autres protéines suite à des interactions électrostatiques. D'ailleurs, il est bien connu que l'albumine se lie et transporte de nombreux ligands, y compris les acides gras, les acides aminés, les hormones, les cations et les anions (Naik, Chimatadar et Nandibewoor, 2010), ou 2) une évaluation inexacte du point isoélectrique de la BSA. En effet, dans la littérature, la valeur du pI de la BSA change d'une source à une autre variant entre 4,7 et 5,6 (Barbosa et al, 2010; Ge et al, 1998; Kongraksawech et al, 2007). Cette variation du pI de la BSA pourrait être due à un changement de sa structure tridimensionnelle qui pourrait être affectée par le pH de la solution et la force ionique.

En dépit des recherches intensives effectuées sur les propriétés physico-chimiques de la BSA, à notre connaissance, aucune étude systématique n'a été effectuée qui met l'accent sur la façon dont le pH affecte la structure tertiaire de la BSA lorsque la macromolécule est présente en grande quantité dans la solution (Barbosa et al, 2010).

En outre, durant la procédure expérimentale, le pH de la solution du FBS n'était pas constant. Malgré l'ajustement continu du pH de la solution du FBS, des

variations notables étaient observées (tableau 8). Cette situation pourrait également expliquer la possibilité de migration de la BSA dans le compartiment de perméat.

Des observations similaires ont été rapportées par Ndiaye et al. 2009, lors d'une étude de séparation de la lactoferrine bovine à partir du lactosérum par la technique d'EDUF. Dans le cadre de cette étude, une migration inattendue de la BSA à pH 5 a été observée dans le compartiment de perméat (Ndiaye, 2009). Ces résultats démontrent la complexité de la séparation spécifique d'une protéine à partir d'un mélange complexe.

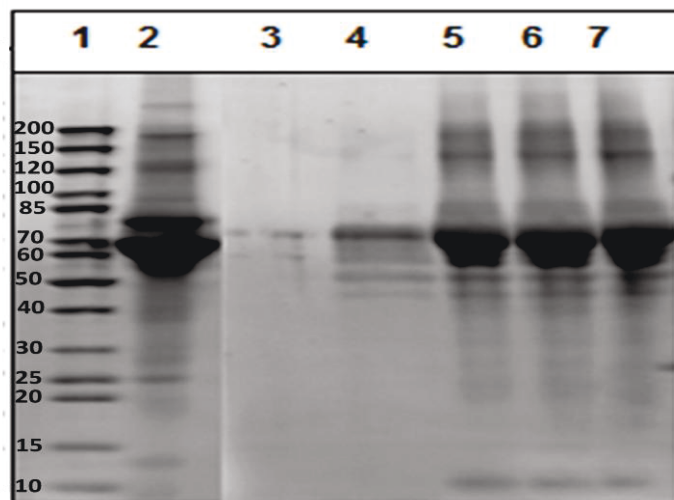


Figure 7: Analyse SDS-PAGE de protéines de la solution de perméat durant 4 heures d'EDUF. Piste 1 : Étalon de masses moléculaires (kDa); Piste 2 : FBS ; Piste 3 : t = 0 h ; Piste 4 : t = 1 h ; Piste 5 : t = 2 h ; Piste 6 : t = 3 h ; Piste 7 : t = 4 h.

Tableau 7: Évolution du pH dans le compartiment du perméat (KCL) et dans le compartiment du FBS durant le processus d'EDUF

Temps (min)	pH	
	KCL	FBS
0	5,7	7,08
0	4,93	5
0	5,09	5,01
15	5,09	5,14
30	6,73	5,1
45	7,4	7,03
60	4	5,08
75	5,69	6,45
90	4,9	5,06
105	4,39	5,55
120	5,53	4,92
135	4,89	6,45
150	4,78	7,02
165	5,4	4,94
180	5,66	6,55
195	4,78	5,12
210	6,4	5,78
225	5,27	6,04
240	5,38	4,76

4.2 Fractionnement du FBS par affinité sur une librairie d'hexapeptides

4.2.1 Détermination des pourcentages de protéines éluées

Durant cette expérience, la capacité d'une librairie d'hexapeptides fixée sur des billes (Proteominer^{MD}) à fractionner des échantillons du FBS a été étudiée. Pour ce faire, l'effet de la charge du FBS sur le fractionnement a été testé (procédure 3.3.12.2). Chaque expérience a été réalisée en duplicata. Les conditions expérimentales ainsi que le pourcentage des protéines retenues dans chaque condition sont présentés au tableau 8.

Tableau 8 : Fractionnement du FBS sur colonne Proteominer^{MD} de 2 ml sous différentes conditions de charge

# Expérience	Charge (ml FBS / ml de billes)	% des protéines retenues (moyenne ± écart-type)
1	2,5	0,57±0,14
2	1,25 (dilué 1:1 avec PBS)	0,96 ± 0,17
3	0,5 (dilué 1:4 avec PBS)	2,87 ± 0,22

À partir des résultats présentés au tableau 8, on observe une augmentation de la fraction de protéines retenues avec la diminution de la charge totale du FBS appliquée à la librairie. Cette constatation est mieux illustrée au graphe ci-dessous (figure 8) qui montre la relation linéaire entre la fraction massique des protéines retenues vs l'inverse de la charge du FBS appliquée. Cette observation pourrait être expliquée par le fait que les billes soient saturées en protéines et qu'alors la quantité totale maximale de protéines adsorbables soit atteinte. Dans tous les cas, la capacité à retenir une plus grande fraction des protéines sériques est souhaitable, car cela augmente alors les chances de trouver dans cette fraction retenue les protéines ayant un effet positif sur la croissance des myoblastes, tout en se débarrassant des protéines de concentrations élevées.

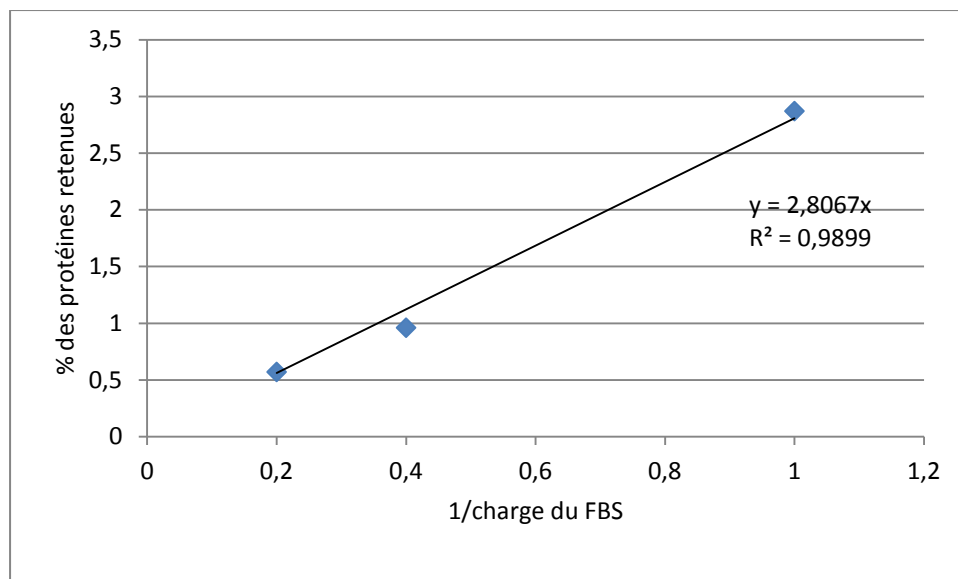


Figure 8: 1/charge du FBS déposée sur les billes d'hexapeptides vs % des protéines retenues.

4.2.2 Électrophorèse sur gel SDS-PAGE des fractions de la librairie d'hexapeptides

La figure 9 présente un gel d'électrophorèse des fractions du FBS obtenues par cette méthode de fractionnement pour différentes charges de FBS. Par exemple, les pistes 6, 7 et 8 représentent les fractions retenues par les billes pour des charges de 5, 2,5 et 1 ml de FBS (ou 2,5, 1,25 et 0,5 ml de FBS/ml de billes) FBS, respectivement. En comparant ces trois pistes, on remarque une similarité au niveau de leur profil protéique ce qui prouve une reproductibilité des résultats. En outre, en comparant les pistes des protéines éluées vs le FBS (piste 2), on remarque une différence significative entre leur composition en protéines. Notamment, la BSA (67 kDa) a été déplétée d'une manière significative alors que de nouvelles bandes apparaissent de manière plus marquée ayant des masses moléculaires 25, 85 et 130 kDa, approximativement. Ces résultats confirment que certaines protéines de faibles abondances dans le FBS ont été concentrées tandis que celles de grandes abondances ont été diluées. Ces résultats d'enrichissement concordent avec le principe de fonctionnement de la librairie d'hexapeptides. Lors d'une étude similaire,

Guerrier et al. ont étudié le fractionnement d'un extrait cellulaire de sang brut par une banque d'hexapeptides.

Dans le cadre de cette étude, il a été démontré que la concentration d'hémoglobine, la protéine majeure dans cet extrait, a été largement réduite, tandis que, plusieurs protéines mineures ont été concentrées. Par la suite, ces protéines ont été analysées par spectrométrie de masse et sur un gel d'électrophorèse 2D. Les auteurs ont rapporté que le nombre de protéines identifiées est passé de 536 à 1289 suite à un traitement avec la librairie d'hexapeptides. Une étude comparative de ces protéines identifiées a révélé que dans l'échantillon traité, 826 protéines ont été nouvellement détectées. Il s'agit là d'un bon exemple qui illustre l'intérêt de cette technique pour enrichir les protéines présentes dans les fluides biologiques à de faibles concentrations (Guerrier, Righetti et Boschetti, 2008a).

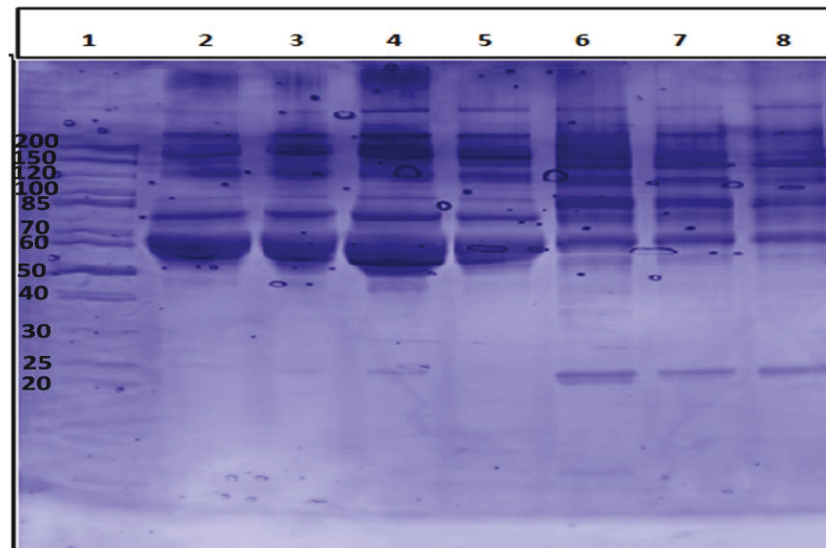


Figure 9: Analyse SDS-PAGE des fractions de FBS fractionnées par librairie d'hexapeptides. Piste 1 : Étalon de masses moléculaires (kDa); Piste 2: FBS; Piste 3: Non-retenu; Piste 4: Lavage 1 ; Piste 5: Lavage 2; Piste 6: Élution de 5ml FBS déposés, Piste 7: Élution de 2,5 ml FBS déposés ; Piste 8: Élution de 1 ml FBS déposé.

Suite à ces expériences, la diafiltration a été investiguée sur les fractions retenues (procédure 3.8.4), ceci afin de 1) changer la composition du solvant dans lequel reposait les fractions obtenues et 2) concentrer les protéines obtenues, diluées par le processus de fractionnement. Les fractions diafiltrées ont été par la suite testées pour leurs effets sur la prolifération des myoblastes. Cependant, aucun effet positif n'a été observé. En dépit de l'étape de diafiltration appliquée, les protéines de ces fractions n'étaient pas capables de rétablir leur activité biologique. Ces résultats pourraient être expliqués, d'une part, par l'étape d'élution qui a été réalisée avec une solution dénaturante constituée de 8 M urée et 5% acide acétique qui a pu mener à une dénaturation irréversible, et d'autre part, par la faible quantité de protéines des fractions éluées. La technique de fractionnement par affinité sur une banque d'hexapeptides semble intéressante pour le fractionnement du FBS ainsi que la détection de nouvelles protéines de faibles concentrations dans ce fluide biologique. Néanmoins, il serait nécessaire de modifier les conditions d'élution, ceci afin d'éviter la possible dénaturation irréversible des fractions obtenues.

4.3 Fractionnement du FBS par chromatographie d'affinité sur bleu de Cibacron

4.3.1 Effet des conditions d'opération sur le fractionnement

Le FBS a été fractionné sur une colonne d'affinité Hitrap Blue HP (procédure 3.3.12.3). Le ligand dans cette colonne est le bleu de Cibacron F3G-A attaché de manière covalente à un support d'agarose réticulé. La fiche technique de cette colonne indique que sa capacité de liaison pour l'albumine humaine (HSA) est d'environ 20 mg/ml de colonne. Puisqu'il s'agit d'une colonne de 5 ml, la capacité de liaison est alors estimée à 100 mg d'albumine humaine, ce qui signifierait approximativement 5 ml de sérum sanguin.

Cette expérience avait pour but de tester la capacité de cette colonne à lier l'albumine bovine. Pour ce faire, différentes charges de FBS ainsi que différents débits ont été testés afin de déterminer la condition qui permettrait une

adsorption maximale de la BSA sur la résine. Dans chaque expérience, 4 fractions des protéines non-retenues (FT1, FT2, FT3 et FT4), d'environ 3 ml chacune, et une fraction d'élution ont été générées. La même expérience a été réalisée en triplicata. Les conditions appliquées ainsi que la fraction massique des protéines retenues dans chaque condition sont présentés au tableau 9.

En comparant les expériences #1 et #3, toutes les deux réalisées avec 1 ml de FBS, mais à deux débits différents (1,5 et 0,5 ml/min), on remarque qu'en diminuant le débit de 3 fois, la fraction des protéines retenues est approximativement le double. Cette observation pourrait être expliquée par le plus long temps de contact des protéines avec la matrice, qui aurait permis un meilleur attachement.

Comme le montre le tableau 9, les expériences #5 et #3, réalisées toutes deux à un débit 0,5 ml/min, mais avec une charge de FBS différente, permettent d'observer un effet dose-réponse. En effet, pour ces deux conditions, en changeant la quantité de FBS déposée sur la colonne de 0,1 à 0,2 ml FBS/ml de colonne, la fraction des protéines retenues a augmenté de 1,75 à 3,37 mg/ml de colonne. Tandis que, pour une augmentation additionnelle de la charge de FBS qui dépasse 0,2 ml FBS/ml de colonne, aucun effet dose-réponse n'a pas été observé. D'ailleurs, on remarque que la quantité de protéines retenues reste approximativement constante pour des charges de FBS supérieures à 0,2 ml de FBS/ml de colonne (condition #3 vs #2). En outre, les résultats des expériences #3 et #4 permettent d'observer que la dilution des protéines de FBS n'a pas d'effet sur l'amélioration de la capacité d'adsorption de la résine.

Ces observations pourraient être expliquées par la saturation de la colonne qui est atteinte lorsque le volume de FBS dépasse 1 ml pour une colonne de 5 ml. Donc la capacité maximale réelle de la colonne, autour de 3,5 mg protéine/ml de colonne, est bien inférieure à la capacité nominale (20 mg HSA/ml de colonne). Ces observations mettent en évidence que les technologies qui sont accessibles

pour traiter les échantillons de sérum humain ne semblent pas adaptées pour traiter le sérum bovin. Ceci démontre une fois de plus l'ampleur du défi que constitue le fractionnement du FBS

Pour la suite des expériences, la condition #2 a été sélectionnée pour préparer du matériel à tester en croissance cellulaire.

Tableau 9 : Fractionnement du FBS sur une colonne Cibacron F3G-A de 5 ml, sous différentes conditions

# Expérience	Charge (ml FBS/ml colonne)	Débit (ml/min)	% des protéines retenues (moyenne ± écartype)	Quantité de protéines retenues (mg protéines /ml colonne)
1	0,2	1,5	22,2 ± 1,7	1,78
2	0,4	0,5	22,3 ± 2,3	3,57
3	0,2	0,5	42,1 ± 1,4	3,37
4	0,2 (dilué 1:1 avec tampon de liaison)	0,5	41,4 ± 3,9	3,31
5	0,1	0,5	43,8 ± 0,6	1,75

4.3.2 Électrophorèse sur gel SDS-PAGE des fractions du FBS obtenues par la chromatographie d'affinité au bleu de Cibacron

La figure 10 montre un gel d'électrophorèse SDS-PAGE des fractions de FBS obtenues suite à une étape de fractionnement par colonne d'affinité au bleu de Cibacron F3G-A. On observe que l'albumine (67 kDa) est la protéine la plus abondante dans le FBS, tel qu'indiqué par la fiche technique du FBS (# lot. KRA25243, Hyclone) où la concentration d'albumine constitue approximativement 55 % des protéines totales. La figure 10 montre que la résine à base de bleu de Cibacron F3G-A permet effectivement de capter

l'albumine, mais également d'autres protéines du FBS (piste 7). De par sa faible sélectivité effective, elle n'était donc pas en mesure d'assurer une déplétion totale de l'albumine. Les pistes de 3 à 6 représentent les 4 fractions non-retenues (FT) récoltées dans leur ordre d'apparition (de 1 à 4). Il est clair que l'albumine est présente d'une manière abondante dans les fractions 1 et 2. Par ailleurs, en comparant les fractions FT vs celle retenue, on remarque que deux bandes à des masses moléculaires approximatives de 58 kDa et 78 kDa ne sont pas présentes dans la fraction attachée à la colonne. Cette observation indique donc une sélectivité partielle de la résine pour les protéines de FBS.

Malgré l'absence de fractionnement tranché de la BSA par rapport aux autres protéines sériques, plusieurs raisons pourraient expliquer la complexité de fractionnement des protéines du FBS. Par exemple, la plupart des produits commerciaux disponibles pour la déplétion des protéines abondantes ont été conçus pour le plasma ou le sérum humains et non bovin (Faulkner et al, 2011).

Bien que l'homologie des séquences de protéines humaines et bovines soit forte, certaines différences existent et pourraient influencer la sélectivité des résines vis-à-vis des protéines à fixer. En outre, il est connu que l'albumine joue un rôle de protéine de transport dans le sang et lie des espèces physiologiquement importantes telles que les hormones, les cytokines et les lipoprotéines (Tirumalai et al, 2003). Par conséquent, les méthodes destinées à la déplétion des protéines de hautes abondances vont également éliminer d'autres espèces non destinées à la déplétion. Ces liaisons non spécifiques pourraient introduire une variabilité significative des résultats vis-à-vis de ceux attendus et expliquer l'ampleur du défi que constitue le fractionnement du FBS.

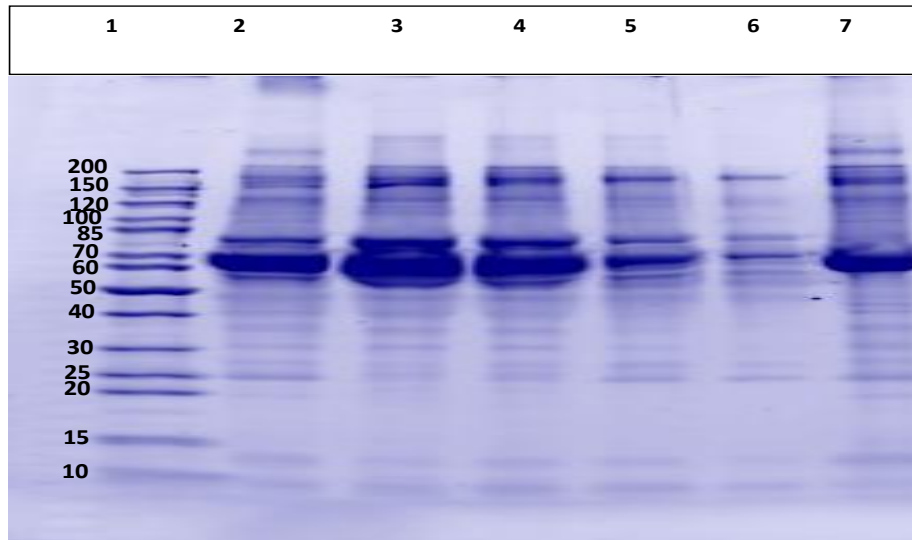


Figure 10: Analyse SDS-PAGE des fractions du FBS séparées par la colonne d'affinité. Piste 1 : Étalon de masses moléculaires (kDa) ; Piste 2 : FBS ; Piste 3 : FT1 ; Piste 4 : FT 2 ; Piste 5 : FT3 ; Piste 6 : FT4 ; Piste 7 : Protéines retenues.

4.3.3 Test en culture cellulaire

Un ml de FBS a été fractionné moyennant la colonne d'affinité Hitrap Blue HP à un débit 0,5 ml/min. L'expérience a été répétée cinq fois afin d'obtenir une quantité suffisante de produit.

Les fractions FT1 et FT2 des protéines non-retenues des 5 répétitions ont été collectées dans un tube (Fraction A) et les 5 fractions des protéines retenues dans un autre tube (Fraction B).

Par la suite, ces préparations ont été diafiltrées afin de les concentrer et de les dessaler. Pour ce faire, 15 ml de chaque tube ont été ultrafiltrés dans des cartouches centrifugeables de 3 kDa, 40 min à 275 g pour concentrer les protéines à un volume final de 1 ml. Le rétentat a par la suite été rincé 2 fois avec 14 ml d'une solution de PBS pH 7,4 afin d'éliminer les sels. Le rétentat final a été récupéré dans un volume de 1 ml, ce qui a permis une concentration des molécules retenues par un facteur 15 et une dilution des petites molécules passant la membrane par un facteur $15^2 = 225$. En outre, la diafiltration a aussi

été appliquée pour 1,5 ml de FBS dilué 10X avec une solution PBS pH 7,4, puis ultrafiltré à un volume final de 1,5 ml (FBS diafiltré). L'effet de ces fractions sur la croissance des myoblastes a été testé. Les conditions de cette expérience ainsi que le ratio d'expansion cellulaire au jour 7 sont présentés au tableau 10 ainsi qu'aux figures 11 à 14.

Tableau 10: Composition et résultats de croissance au jour 7 des fractions du FBS obtenues par fractionnement sur colonne Hitrap Blue HP

#	Conditions	Ratio d'expansion
1	MB1	-
2	MB1+15 % FBS	30
3	MB1 +15 % FBS diafiltré	3,625
4	MB1 +15 % Fraction A	0
5	MB1+15 % Fraction B	0

Comme le montre ces résultats, les fractions A et B (conditions #4 et #5) obtenues suite à un fractionnement du FBS par la colonne d'affinité Hitrap Blue HP ne supportent pas la croissance des myoblastes, en comparaison avec le contrôle positif (#2), le milieu contenant du sérum non-diafiltré. Cependant, un 2^{ème} contrôle, mais où du FBS diafiltré a été ajouté (condition #3) ne permet pas non plus une croissance des myoblastes. Cela indique que la diafiltration en soi élimine des molécules utiles à la croissance cellulaire et que le test des fractions obtenues sur résine au bleu de Cibacron est affecté par cette procédure. Or, un moyen de concentration et de remplacement de tampon est essentiel au traitement des fractions, si non le solvant original dans lesquelles elles reposent serait toxique à la culture des myoblastes. Il est donc pour l'instant impossible de tester l'efficacité des fractions obtenues par fractionnement sur la résine Hitrap Blue HP à supporter la croissance des myoblastes tant qu'un moyen

neutre pour conditionner ces fractions (changer leur tampon et les concentrer) n'aura pas été identifié.

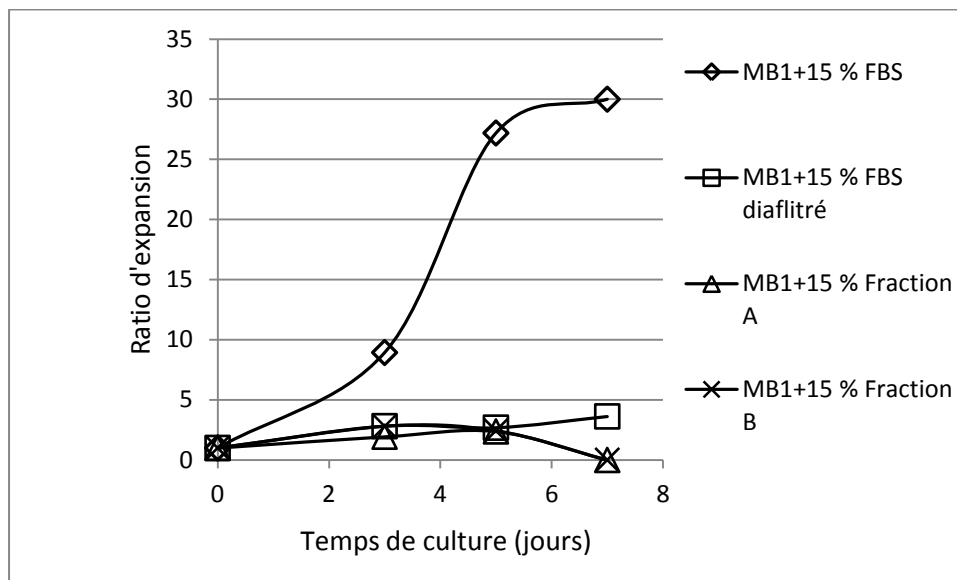


Figure 11: Effet des fractions du FBS obtenues sur la colonne Hitrap Blue HP. Profil de croissance des myoblastes durant 7 jours de culture.

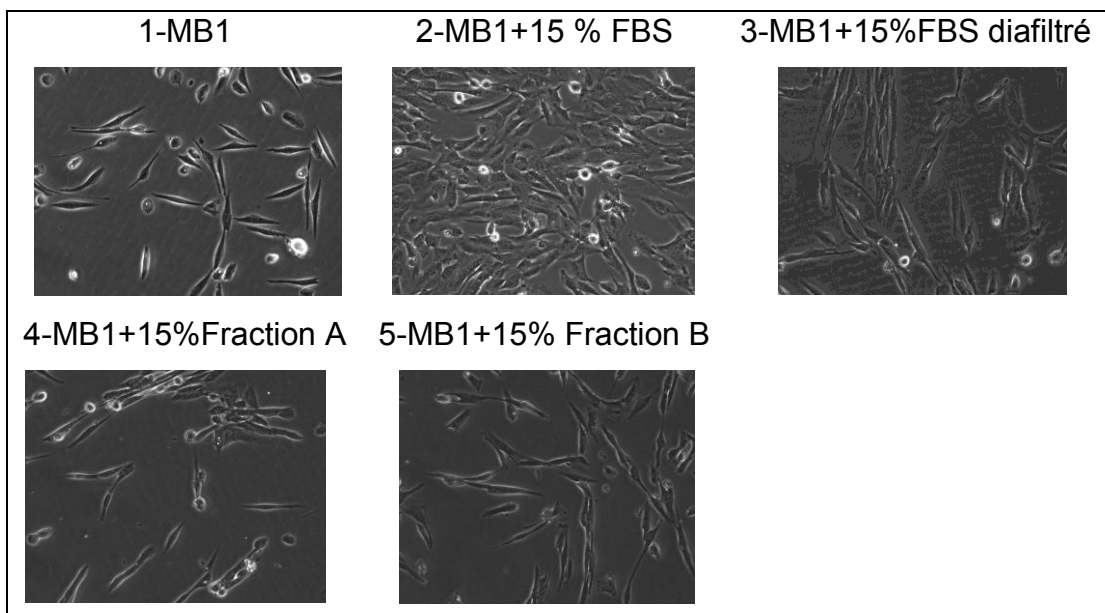


Figure 12: Effet des fractions de la colonne Hitrap Blue HP. Microscopie 20X au jour 3.

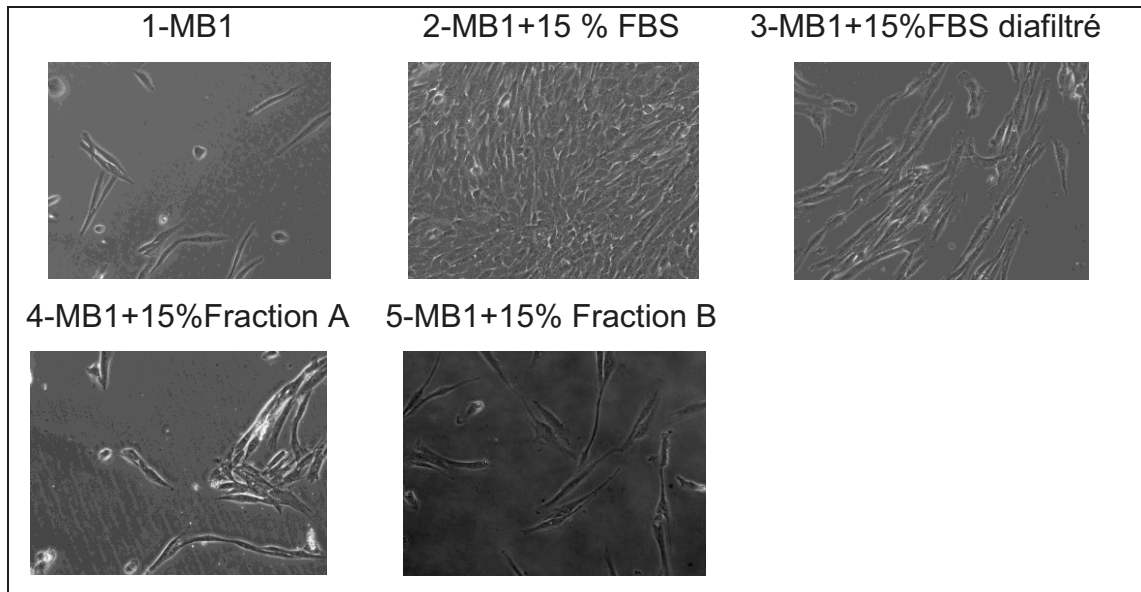


Figure 13: Effet des fractions de la colonne Hitrap Blue HP. Microscopie 20X au jour 5.

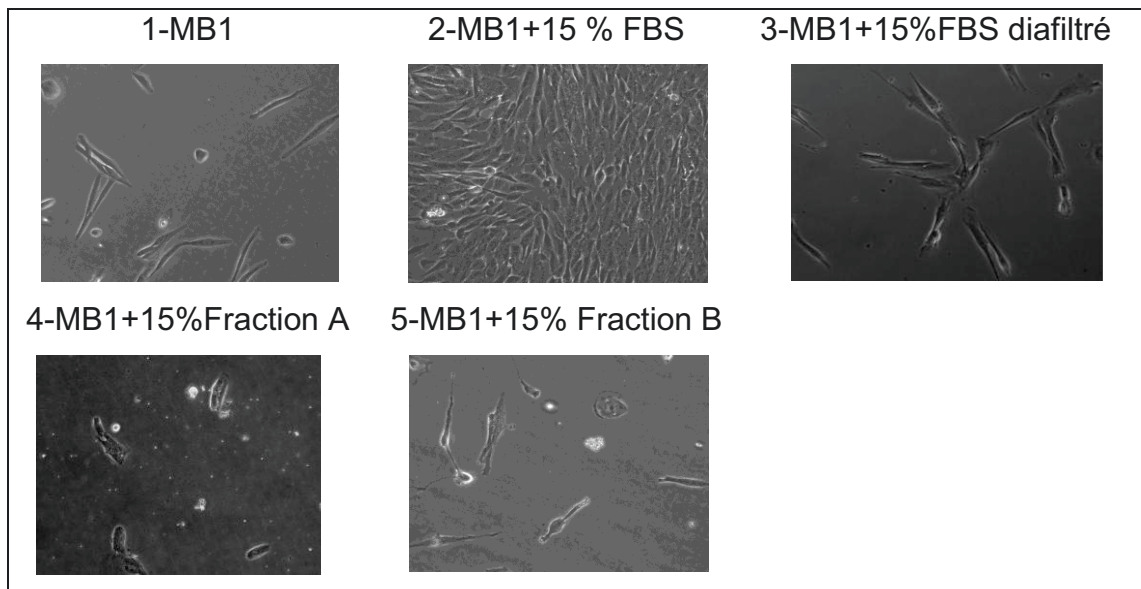


Figure 14 : Effet des fractions de la colonne Hitrap Blue HP. Microscopie 20X au jour 7.

D'autres expériences ont été réalisées afin de cerner l'effet important des petites molécules de FBS éliminées lors de la diafiltration. Pour ce faire, 14 ml de FBS ont été diafiltrés dans des cartouches centrifugeables de 3 kDa, 50 min à 275 g. Deux fractions ont été alors obtenues. La première fraction correspond au rétentat de volume 4 ml. Tandis que la deuxième fraction est l'éluat de volume 10 ml. Par la suite, le rétentat a été divisé dans deux tubes en deux volumes égaux. Dans le premier tube, le rétentat a été dilué avec une solution du PBS pH 7,4 afin d'être dilué à sa concentration initiale en protéines mais dépourvu des petites molécules éliminées lors de l'étape de la diafiltration, tandis que, le rétentat dans le deuxième tube a été équilibré avec l'éluat, correspondant donc à du FBS reconstitué.

Les conditions expérimentales de ces expériences ainsi que le ratio d'expansion cellulaire au bout d'une culture de 7 jours sont présentés au tableau 11 ainsi qu'aux figures 15 à 18.

Tableau 11: Composition et résultats de croissance au jour 7 des fractions du FBS des obtenues par la diafiltration

#	Conditions	Ratio d'expansion au jour 7
1	MB1	-
2	MB1+15 % FBS	22,5
3	MB1 +15 % rétentat	8,44
4	MB1+15 % éluat	8,13
5	MB1 + 15 % FBS reconstitué	24,38

D'après la figure 15, on observe que ni le rétentat (condition #3) ni l'éluat (condition #4) n'assurent une croissance satisfaisante des myoblastes. Néanmoins, on remarque que le FBS reconstitué (condition #5) permet d'assurer une croissance cellulaire similaire au contrôle positif (condition #2). Ces observations confirment que la diafiltration élimine des molécules utiles,

dont la taille est inférieure au MWCO de 3 kDa, telles possiblement des acides aminés essentiels qui favorisent une croissance adéquate des myoblastes. Par ailleurs, la mesure de la concentration en protéine de cet éluat, à 0,016 mg/ml, indique que ces molécules actives ne semblent pas de nature protéique.

Donc, si un moyen est nécessaire pour changer un tampon utilisé lors de l'application d'une méthode de fractionnement, ou pour concentrer la fraction obtenue, il devra s'appuyer sur une technique permettant de conserver les molécules présentement éluées sur une membrane de 3 kDa. D'une part, l'évaporation à froid peut permettre de concentrer une fraction, mais ne permettra pas de séparer des molécules de tampon indésirables. D'autre part, un procédé d'ultrafiltration, sur une membrane dont la porosité est inférieure à 3 kDa, pourrait être la seule façon d'atteindre cet objectif double. Cependant, à notre connaissance il existe très peu de produits de dialyse ou d'ultrafiltration dans cette gamme de taille de pores. Parmi ces produits, on peut nommer le mini Kit de dialyse 1 kDa (GE Healthcare, 80-6483-75).

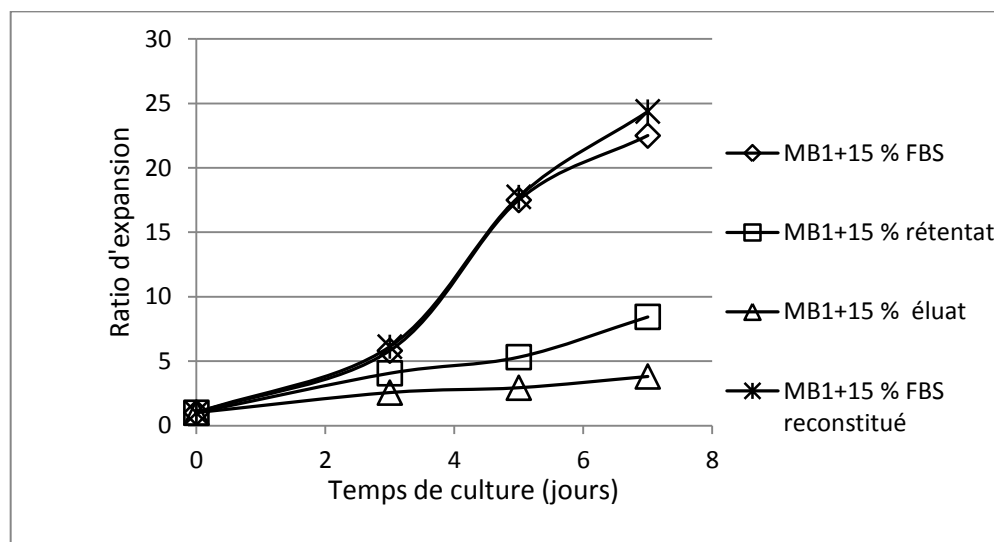


Figure 15: Effet de la diafiltration du FBS. Profil de croissance des myoblastes durant 7 jours de croissance cellulaire.

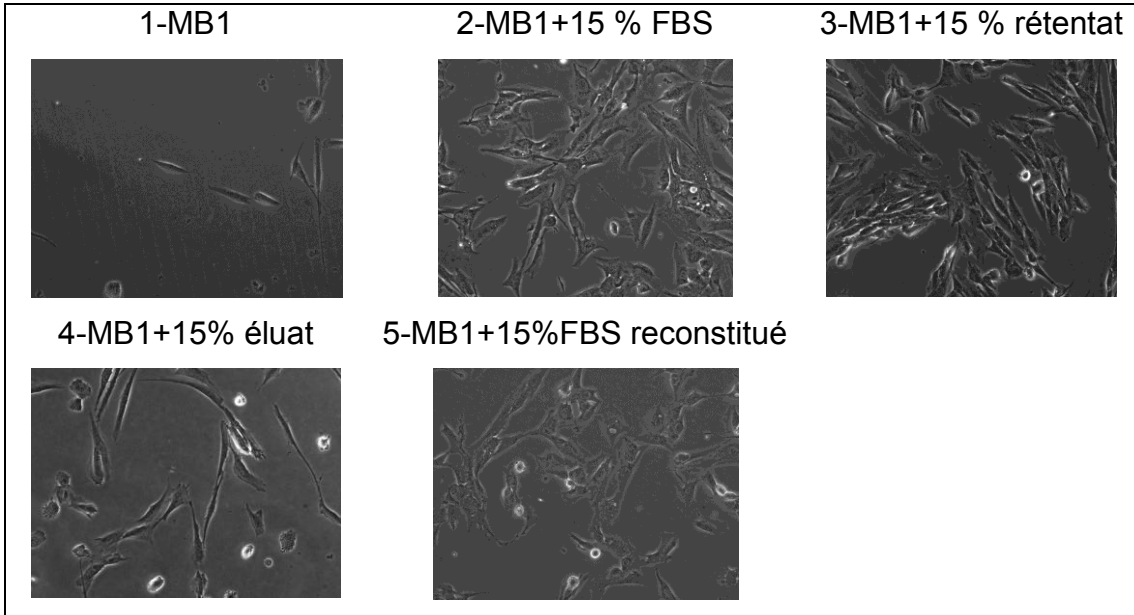


Figure 16 : Effet de la diafiltration du FBS. Microscopie 20X au jour 3.

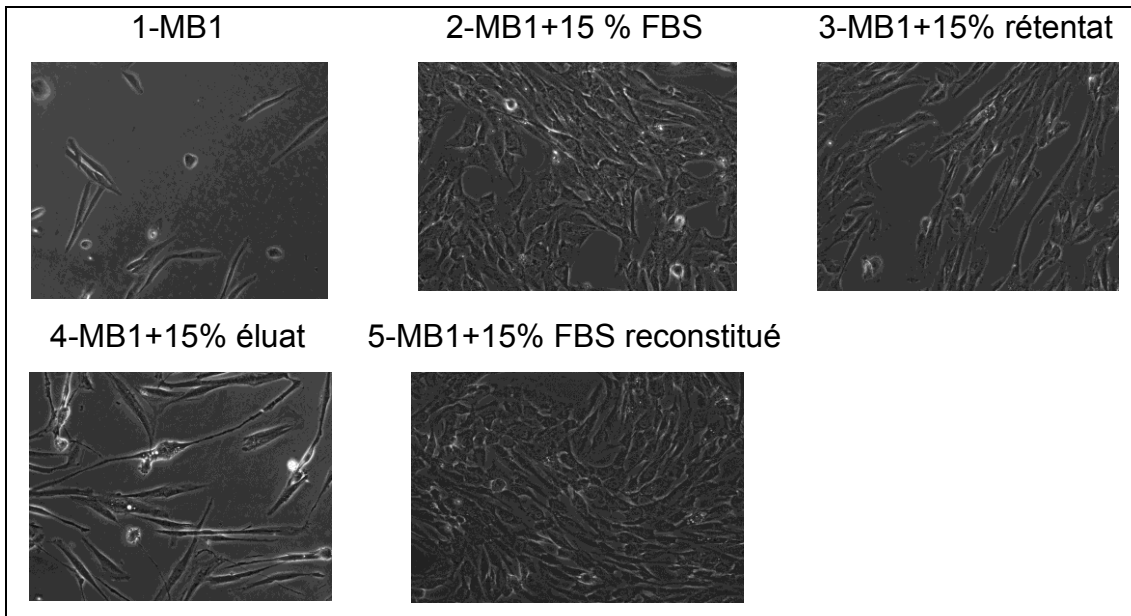


Figure 17: Effet de la diafiltration du FBS. Microscopie 20X au jour 5.

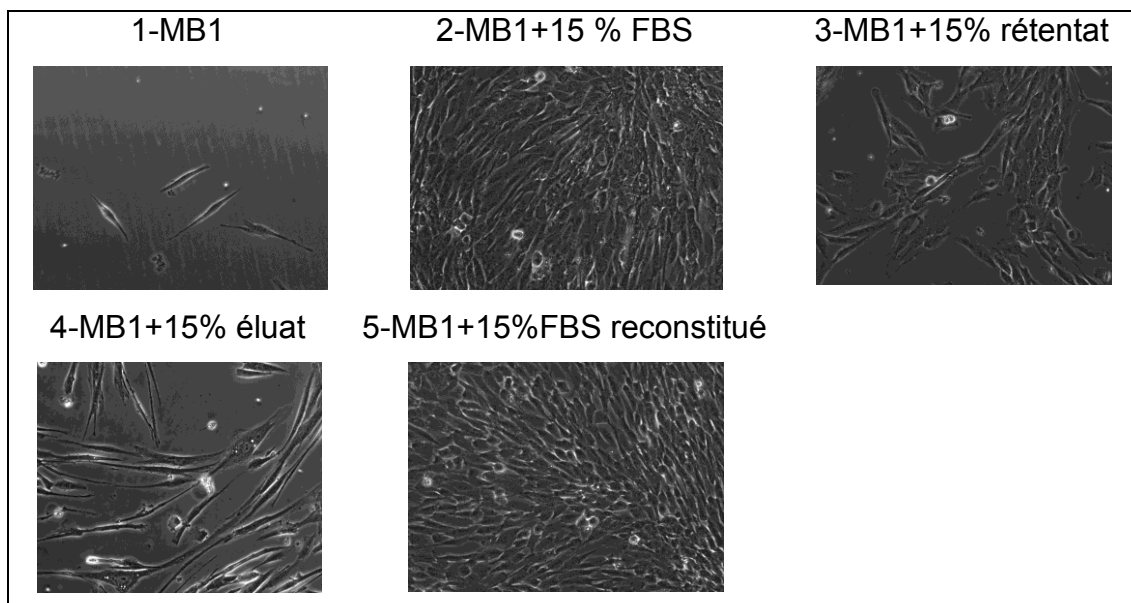


Figure 18: Effet de la diafiltration du FBS. Microscopie 20X au jour 7.

4.4 Caractérisation chimique du colostrum LP1.5

4.4.1 Détermination de la teneur en protéine

La concentration en protéine de la préparation de colostrum bovin LP1.5 a été mesurée par la méthode de Bradford, en triplicata. Cette concentration est de $3,21 \pm 0,38$ g/L (moyenne \pm écart-type). Cette valeur est d'un ordre de grandeur inférieure à celle du FBS (38 g/L). Cela pourrait impliquer que les facteurs actifs pour la croissance cellulaire sont également plus dilués et qu'il pourrait être utile de concentrer cette préparation pour qu'elle ait un effet.

4.4.2 Détermination de la teneur en matière sèche.

4.4.2.1 Colostrum bovin LP1.5 non concentré

En appliquant la méthode décrite en 3.3.11, la concentration en matière sèche du LP1.5 est de $97,15 \pm 0,28$ g/L. La masse mesurée ne variait pas significativement entre 6h et 12 h de séchage. On peut penser que toute concentration par évaporation du LP1.5 pourrait mener à des concentrations trop élevées de ces matières sèches. En concentrant le LP1.5 par diafiltration,

une partie de cette masse sèche (particulièrement les sels ou toute autre petite molécule) pourrait cependant être éliminée.

4.4.2.2 Colostrum bovin LP1.5 concentré

Le LP1.5 a été fractionné/concentré 10X par ultrafiltration (procédure 3.3.12.4) sur une membrane de 3 kDa. La concentration en matière sèche du rétentat était de $144,27 \pm 13,85$ g/L après 12 h de séchage. Cela signifie que 5,24 g/L de la matière sèche contenue dans le LP1.5 a été retenue sur la membrane de 3 kDa, alors que 91,92 g/L en a été éluée, soit 94,6%. Cet éluat est donc probablement principalement constitué de sels, dont la masse moléculaire est inférieure à 3 kDa.

4.4.3 Électrophorèse sur gel SDS-PAGE

La figure 19 montre un gel SDS-PAGE typique du LP1.5, comparé à celui du FBS. On peut y observer une différence significative entre la composition en protéines du LP1.5 vs le FBS. Pour le LP1.5, 4 bandes de haute abondance sont visibles, à des masses moléculaires approximatives de 13, 17, 27 et 58 kDa, correspondant aux numéros de bande 1 à 4 respectivement. Il est également clair que le LP1.5 contient peu d'albumine (MM = 67 kDa), alors que cette protéine est abondante dans le FBS.

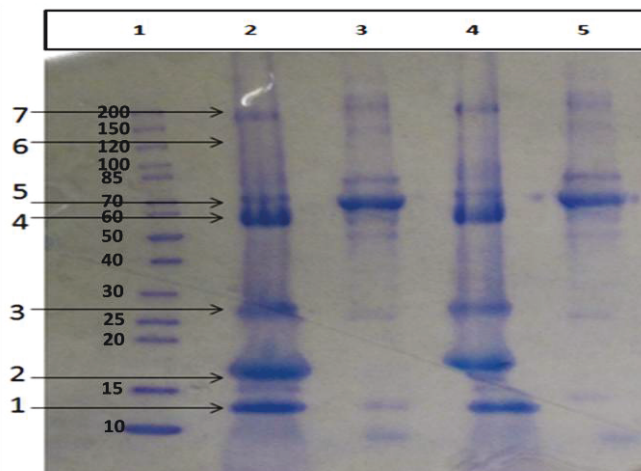


Figure 19: Analyse SDS-PAGE du LP1.5. Piste 1 : Étalon de masses moléculaires (kDa); Pistes 2 & 4 : LP1.5; Pistes 3 & 5 : FBS.

4.4.4 Identification des protéines par spectroscopie de masse

7 bandes de protéines de LP1.5 ont été indiquées par des flèches numérotées de 1 à 7 sur la figure 19 et envoyées pour identification par spectrométrie de masse. Un spectromètre Triple TOF 5600 plus (AB SCIEX) a été employé. Ce Triple TOF est couplé à un système de séparation des peptides par HPLC et à une source nanospray. Ce système assure une haute résolution et une haute vitesse de séquençage en un seul analyseur. La composition la plus probable pour ces 7 bandes est indiquée au tableau 12. Cependant, plusieurs autres protéines candidates ont également été identifiées par MS.

Tableau 12 : Composition la plus probable des 7 bandes majeures du SDS-PAGE de LP1.5

# Bande	Code	Nom	# accession	MM (kDa)	P(%) et nb de fragments
1	LALBA_BOVIN	Alpha-lactalbumin	P00711 (+2)	16	100 % (21)
2	B5B0D4_BOVIN	Major allergen beta-lactoglobulin	B5B0D4	20	100 % (32)
3	Q1RMN8_BOVIN	Immunoglobulin light chain, lambda gene cluster	Q1RMN8	25	100 % (30)
4	Q3T101_BOVIN	IGL@ protein	Q3T101 (+9)	25	100 % (15)
5	ALBU_BOVIN	Serum albumin	P02769	69	100 % (96)
6	B3VTM3_BOVIN	Lactoferrin	B3VTM3 (+3)	78	100 % (61)
7	G3X6N3_BOVIN	Serotransferrin	G3X6N3	78	100% (31)

4.5 Effet du LP1.5 sur la culture de myoblastes humains

4.5.1 Essais préliminaires

Des essais de prolifération sur la croissance des myoblastes avec le colostrum LP1.5 brut en combinaison avec du FBS ont été exécutés. Les conditions de l'expérience ainsi que le ratio d'expansion cellulaires durant une culture de 7 jours sont présentés au tableau 13 ainsi qu'aux figures 20 à 23.

Tableau 13 : Composition des mélanges de LP1.5 et de FBS pour les essais préliminaires

# Conditions	Milieu de base	% LP1.5	% FBS	Ratio d'expansion au jour 7
1	MB1	-	-	-
2	MB1	-	15	22,5
3	MB1	15	-	0
4	MB1	7,5	7,5	0
5	MB1	7,5	-	0
6	MB1	-	7,5	8,4

Remarque : chaque condition est effectuée en duplicata; (-) indique l'absence du nutriment.

Les résultats montrent que LP1.5 ne permet pas l'adhésion cellulaire (condition #3 et #5) (voir figures 21-23). De plus, en comparant les conditions #4 et #6, on remarque que l'ajout de 7,5 % LP1.5 à 7,5% FBS (condition #4) nuit à la croissance des cellules comparativement à la condition supplémentée uniquement avec 7,5 % FBS (condition #6). Ces résultats laissent penser que le LP1.5 nécessitera un traitement supplémentaire pour avoir un effet positif sur la croissance cellulaire.

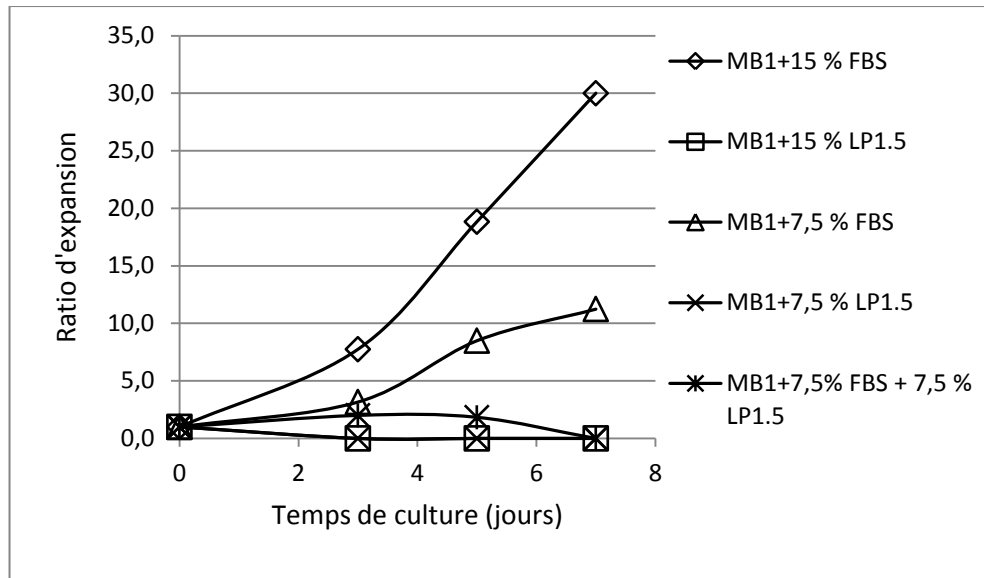


Figure 20: Essais préliminaires. Profil de croissance des myoblastes pour chaque condition durant 7 jours de culture.

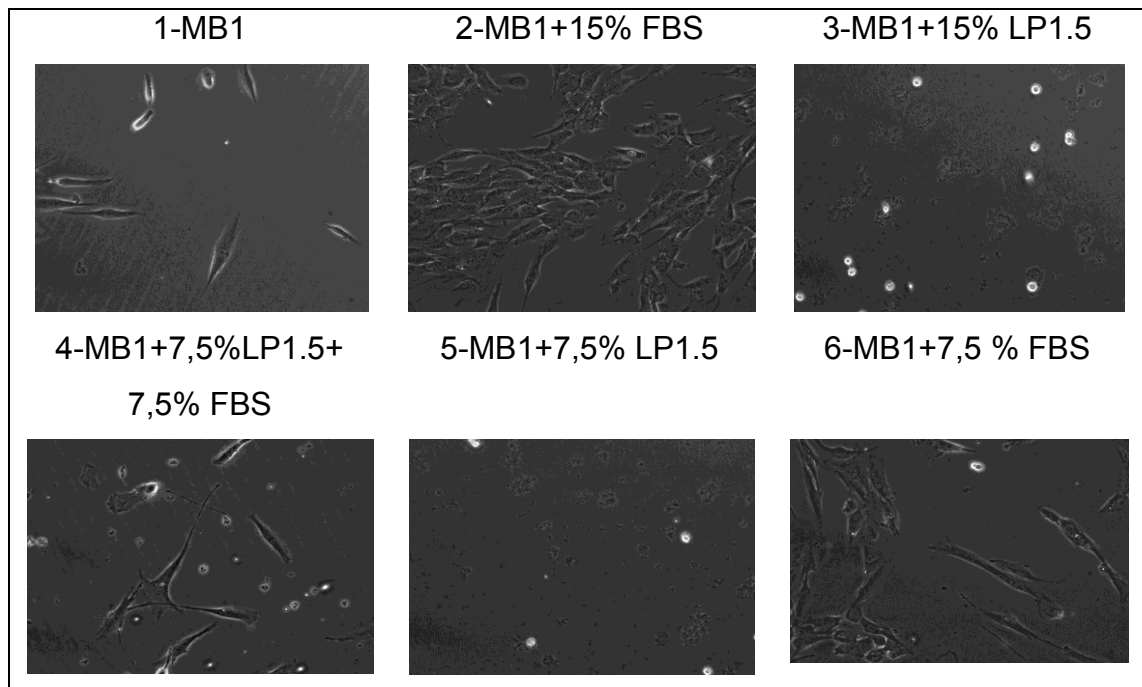


Figure 21: Essais préliminaires. Microscopie 20X au jour 3.

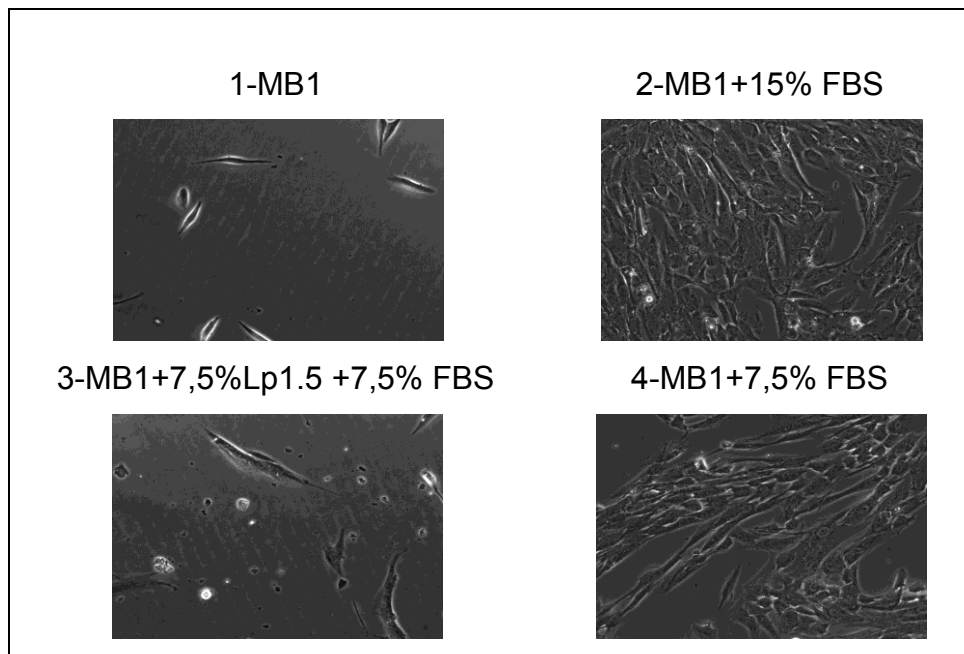


Figure 22: Effet du LP 1.5 - Essais préliminaires. Microscopie 20X au jour 5.

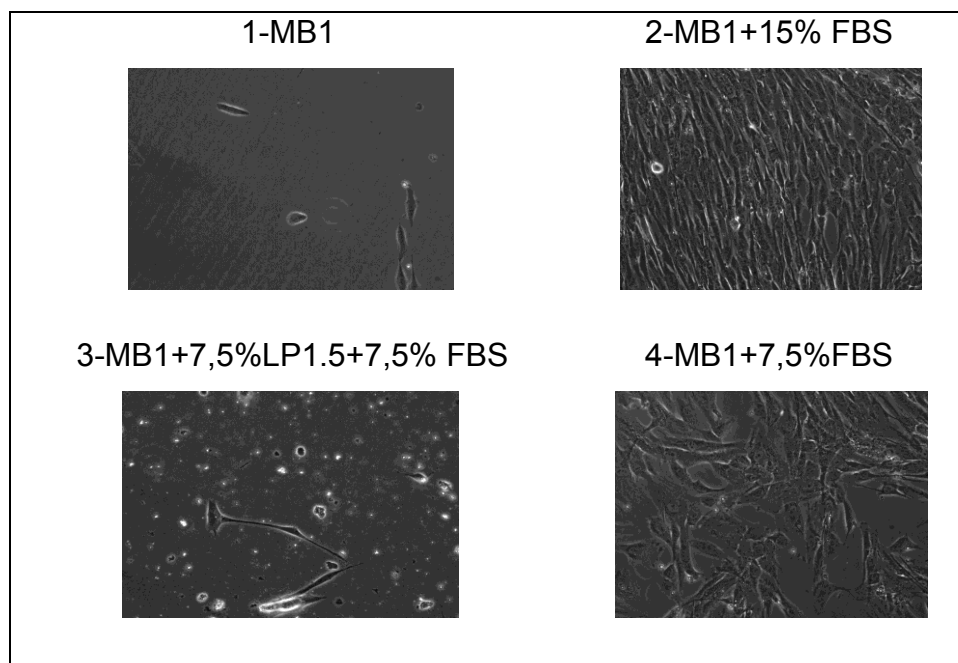


Figure 23: Effet du LP1.5-Essais préliminaires. Microscopie 20X au jour 7.

4.5.2 Essais avec LP1.5 concentré

La teneur en protéines du LP1.5 étant approximativement 10 fois inférieure au FBS, l'effet de la concentration du LP1.5 a été testé. Du LP1.5 concentré 10X par ultrafiltration sur membrane de 3 kDa (LP10X) a été testé sous différentes concentrations et combinaisons avec le FBS (tableau 14).

Tableau 14 : Composition des mélanges de LP1.5 concentré 10X (LP10X) et du FBS pour les essais préliminaires

# Conditions	Milieu de base	% LP10X	% FBS
1	MB1	-	-
2	MB1	-	15
3	MB1	15	-
4	MB1	7,5	7,5
5	MB1	7,5	-
6	MB1	-	7,5

Remarque : chaque condition est effectuée en duplicata; (-) indique l'absence du nutriment

Comme le montre la micrographie de la figure 24, dès le jour 3, on remarque une mort cellulaire importante dans les conditions #3 et #5, en présence uniquement de LP1.5, ainsi que l'absence d'adhésion cellulaire, à un niveau qui est encore plus important que le contrôle négatif (condition #1) où aucun LP1.5 ni FBS n'est présent. Le colostrum LP1.5 simplement concentré semble donc avoir un effet négatif sur la croissance et l'attachement des myoblastes en absence de sérum, bien que cet effet semble atténué en présence de 7,5% FBS, tel qu'il est possible de l'observer en comparant les conditions #4 et #6. Ces résultats pourraient être expliqués par le pH acide de la solution de colostrum. En effet, une mesure du pH du LP1.5 ou du LP10X a indiqué qu'il

était de 4,85, valeur inhibitrice pour la culture cellulaire. Dans le cas des conditions #4 et #6, le FBS pourrait alors avoir un certain effet tampon.

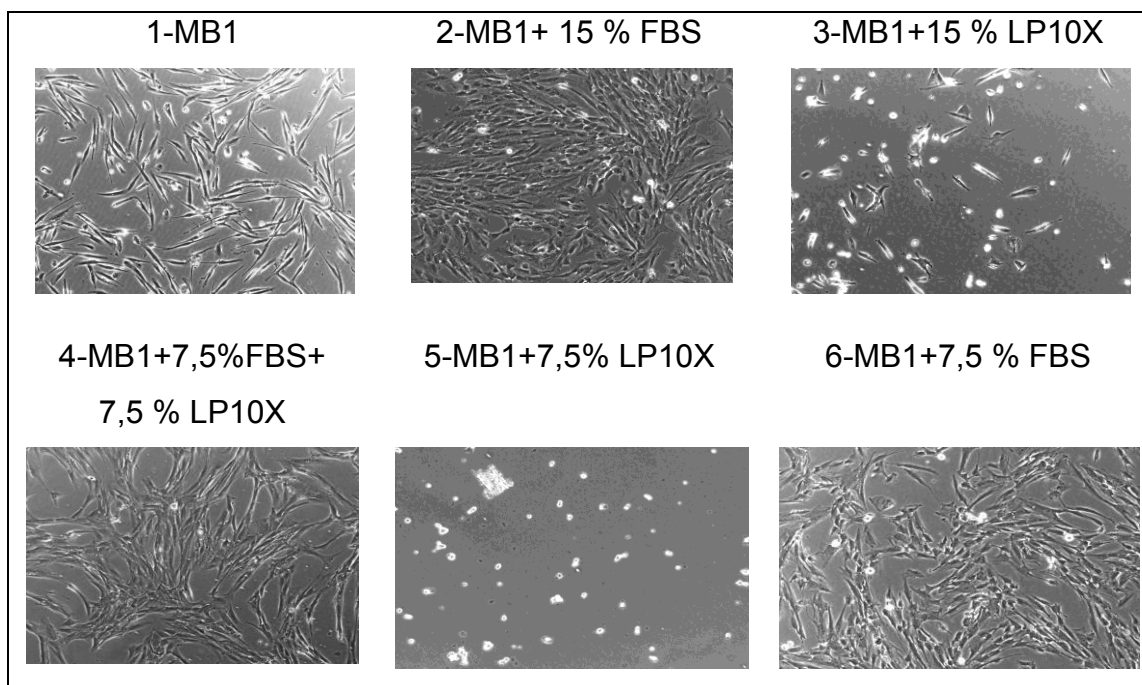


Figure 24: Effet du LP1.5 concentré. Microscopie 10X au jour 3.

4.5.3 Essais avec LP1.5 diafiltré

Afin d'évaluer si la forte concentration de petites molécules, ainsi que le pH, pouvaient interférer avec l'effet des protéines contenues dans le LP1.5, la diafiltration a été investiguée. Pour ce faire, 15 ml de colostrum LP1.5 ont été ultrafiltrés dans des cartouches centrifugeables de 3 kDa, 50 min à 275 g. Le rétentat (1 ml) a par la suite été rincé 2 fois avec 14 ml d'une solution de PBS pH 7,4. Le rétentat final a été récupéré dans un volume de 1 ml, correspondant donc à du LP1.5 concentré 15X duquel les petites molécules ont été diluées par un facteur $15^2 = 225$ et remplacées par celles du PBS à un pH de 7,4 par diafiltration (LP15Xd). Différentes concentrations et combinaisons de LP15Xd ont alors été testées. Ces conditions ainsi que le ratio de croissance au bout de 7 jours sont présentés au tableau 15 ainsi qu'aux figures 25 à 28.

Tableau 15 : Composition et résultats de croissance au jour 7 des mélanges de LP15Xd et du FBS

# Conditions	Milieu de base	% LP15Xd	% FBS	Ratio d'expansion au jour 7
1	MB1	-	-	-
2	MB1	-	15	30
3	MB1	15	-	0
4	MB1	7,5	7,5	27
5	MB1	7,5	-	0
6	MB1	-	7,5	17,63

Remarque : chaque condition a été testée en duplicata; (-) indique l'absence de la fraction.

On y observe que l'ajout de 7,5 % LP15Xd dans un milieu contenant 7,5 % FBS a un effet positif sur la culture (conditions #4 vs #6), comparable à la culture avec 15% FBS (condition #2). Cependant, un milieu ne contenant que du LP15Xd (7,5% ou 15%) n'a toujours pas la capacité de supporter l'adhésion cellulaire, et encore donc moins la croissance (conditions #5 et #3, respectivement). Ces résultats suggèrent que le FBS et le colostrum agissent en synergie afin de stimuler la croissance des myoblastes. Cependant, les concentrations de FBS requises pour que le colostrum ait un effet restent importantes (7,5%).

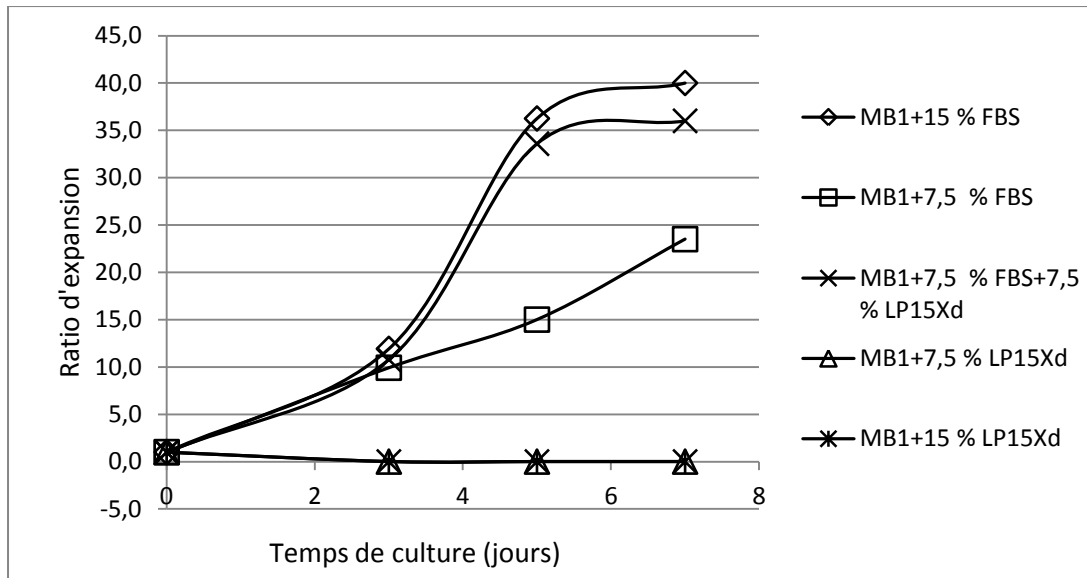


Figure 25: Effet de LP15Xd. Profil de croissance cellulaire des myoblastes durant 7 jours de culture.

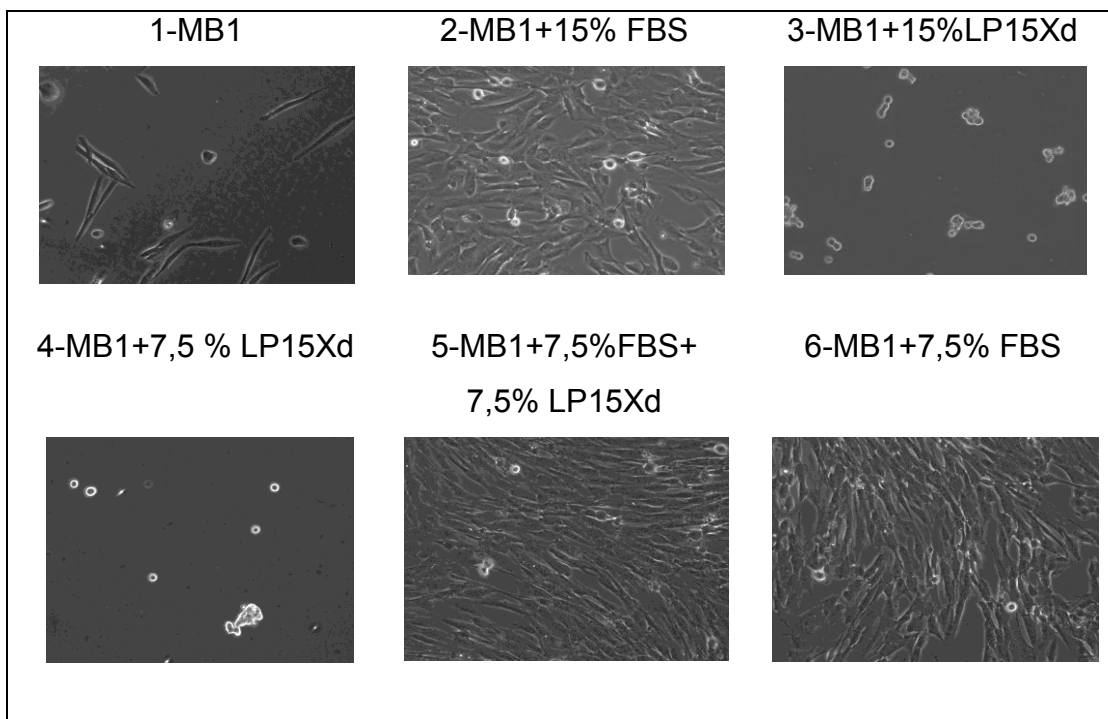


Figure 26: Effet du LP15Xd; Microscopie 20X, jour 3.

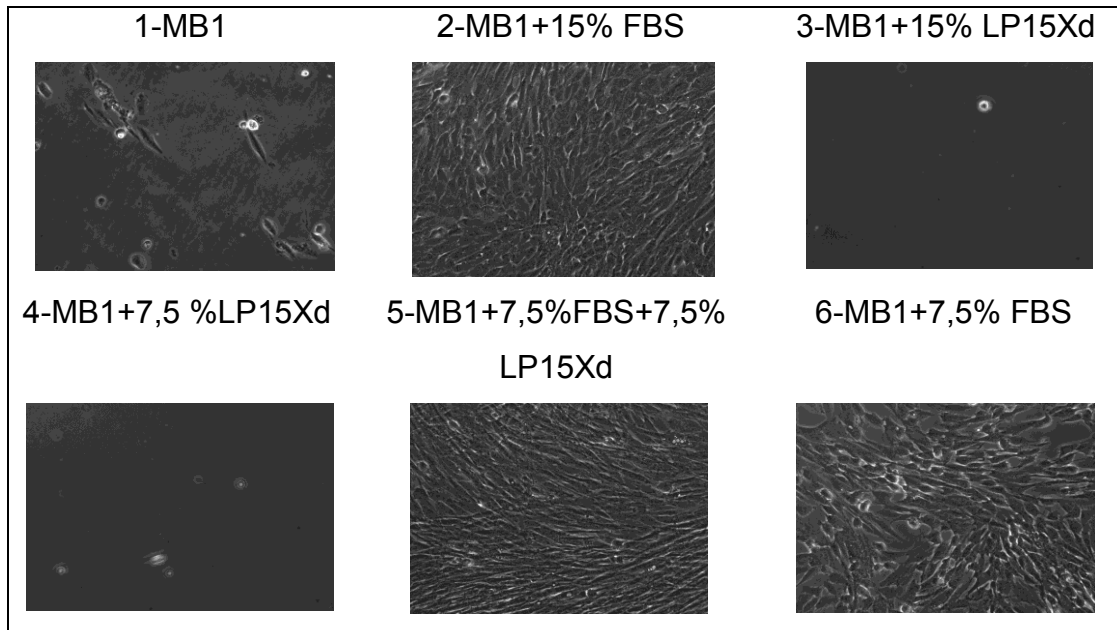


Figure 27 : Effet du LP15Xd; Microscopie 20X, jour 5.

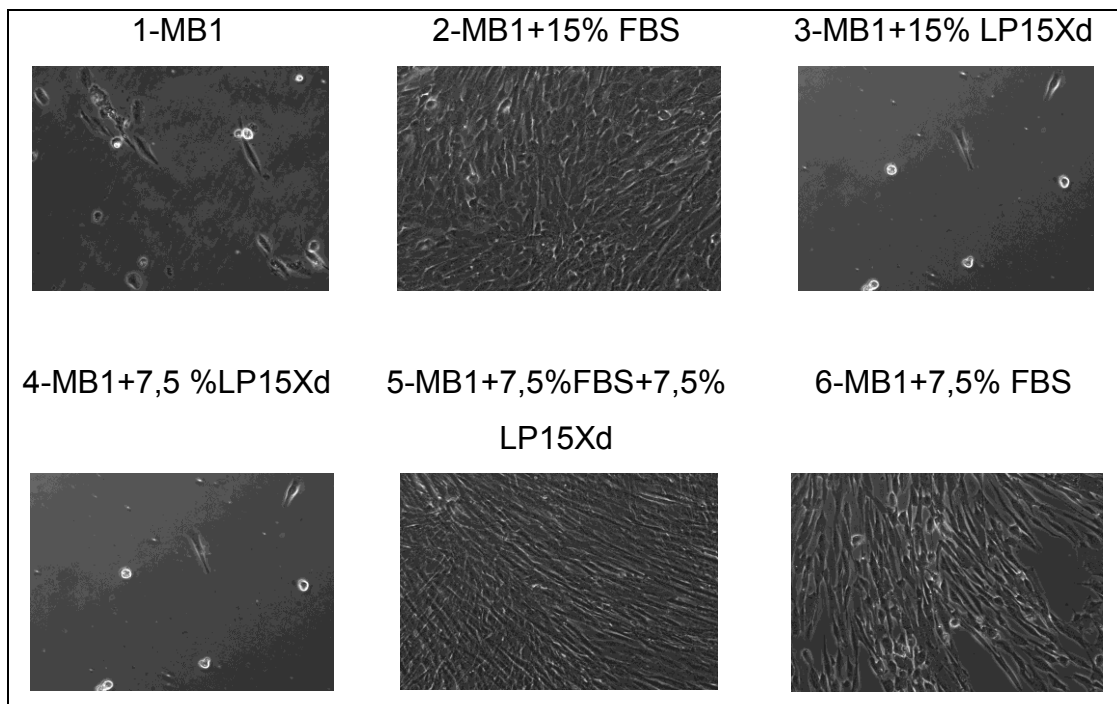


Figure 28: Effet du LP15Xd. Microscopie 20X, jour 7.

Afin de mieux caractériser cette synergie entre le colostrum et le FBS, un plan d'expérience plus serré a été réalisé. Pour ce faire, un plan factoriel à 2 niveaux avec point au centre, où les niveaux étaient de 1% et 7,5% pour le FBS et de 5% et 10% pour le LP15Xd, a été complété, accompagné de 4 contrôles en absence de colostrum, à des concentrations de 0%, 1%, 7,5% et 15% de FBS. Ces conditions expérimentales ainsi que les résultats du ratio d'expansion au bout d'une culture de 7 jours sont présentés au tableau 16.

La figure 29 (ainsi que les micrographies des figures 30 à 32) permettent de confirmer que le colostrum concentré et diafiltré (LP15Xd) a un effet positif sur la croissance des myoblastes en présence d'une quantité réduite en FBS. En effet, on remarque d'abord que le nombre de cellules dans les conditions #5 et #6 au jour 7, avec colostrum, est 4 fois plus élevé par rapport au nombre de cellules dans la condition #2, sans colostrum, toutes à 1% FBS. Le colostrum diafiltré et concentré a donc un effet important sur la récupération de la capacité du milieu de culture à supporter la croissance à faible concentration de FBS (1%). Aussi, pour les conditions #7 et #8, avec colostrum, on remarque que le nombre de cellules est environ 1,5 plus élevé que le nombre de cellules dans la condition #3, sans colostrum, toutes à 7,5% FBS. Cependant, cette capacité semble plafonner au niveau du contrôle positif, à 15% FBS sans colostrum et alors ne plus dépendre de la quantité de LP15X ajouté (comparaison des conditions #7 vs #8). Également, les conditions #5 et #6, toutes deux à 1% FBS, mais à 2 concentrations de LP1.5 différentes (5 % et 10 %) ne permettent toujours pas d'observer un effet dose-réponse du colostrum, qui ne supporte alors que 50% de récupération de la capacité à supporter la croissance par rapport au contrôle positif. La complexité de cette interaction des deux facteurs peut être observée plus clairement à la figure 33, où l'effet combiné du colostrum et du FBS est montré sur un graphe 3D. Globalement, ces résultats suggèrent qu'un ajout de 5 % de colostrum 15X diafiltré pourra être utile et suffisant pour stimuler la croissance des myoblastes. À 1% FBS, cet ajout pourrait permettre d'atteindre des concentrations cellulaires équivalentes à 50% du contrôle positif (contenant

15% FBS), alors qu'à 7,5 % FBS, la concentration cellulaire maximale du contrôle positif serait atteignable.

Tableau 16 : Composition et croissance des myoblastes au jour 7 pour des mélanges de colostrum LP15Xd et du FBS

# Conditions	Milieu de base	% LP15Xd	% FBS	Ratio d'expansion au jour 7
1	MB1	-	-	-
2	MB1	-	1	2,82
3	MB1	-	7,5	13,75
4	MB1	-	15	20,63
5	MB1	5	1	9,88
6	MB1	10	1	11
7	MB1	5	7,5	20
8	MB1	10	7,5	21
9	MB1	7,5	4,25	15,5

Remarque : (-) indique l'absence de la fraction.

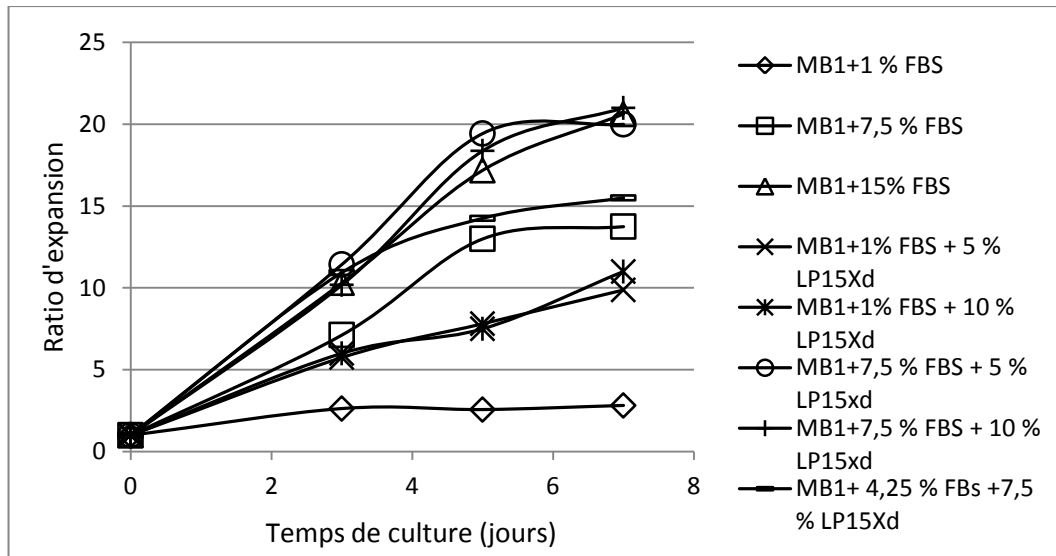


Figure 29: Effet du LP15Xd – plan factoriel complet; Profil de croissance cellulaire.

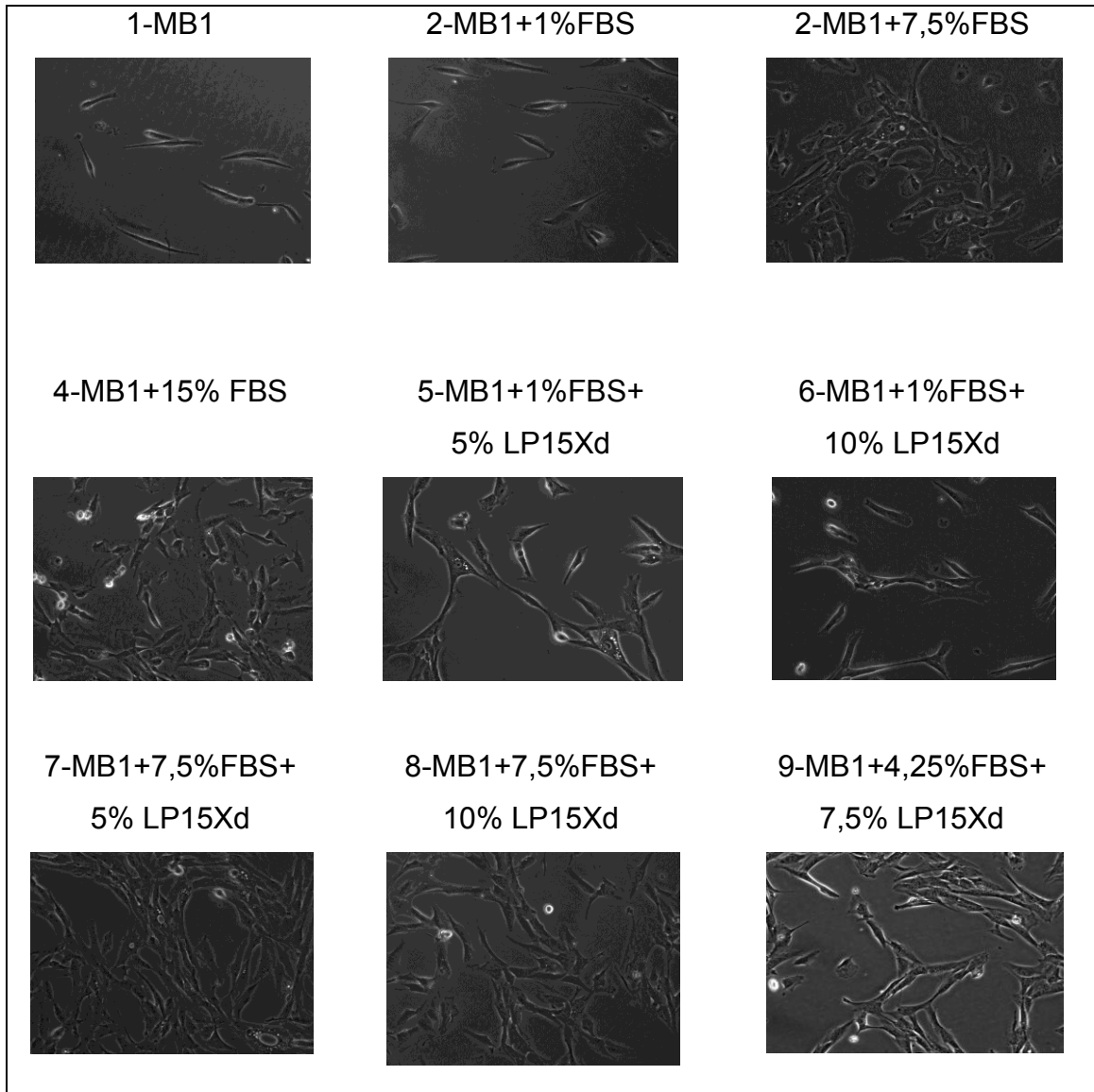


Figure 30 : Effet du LP15Xd – plan factoriel complet; Microscopie 20X au jour 3.

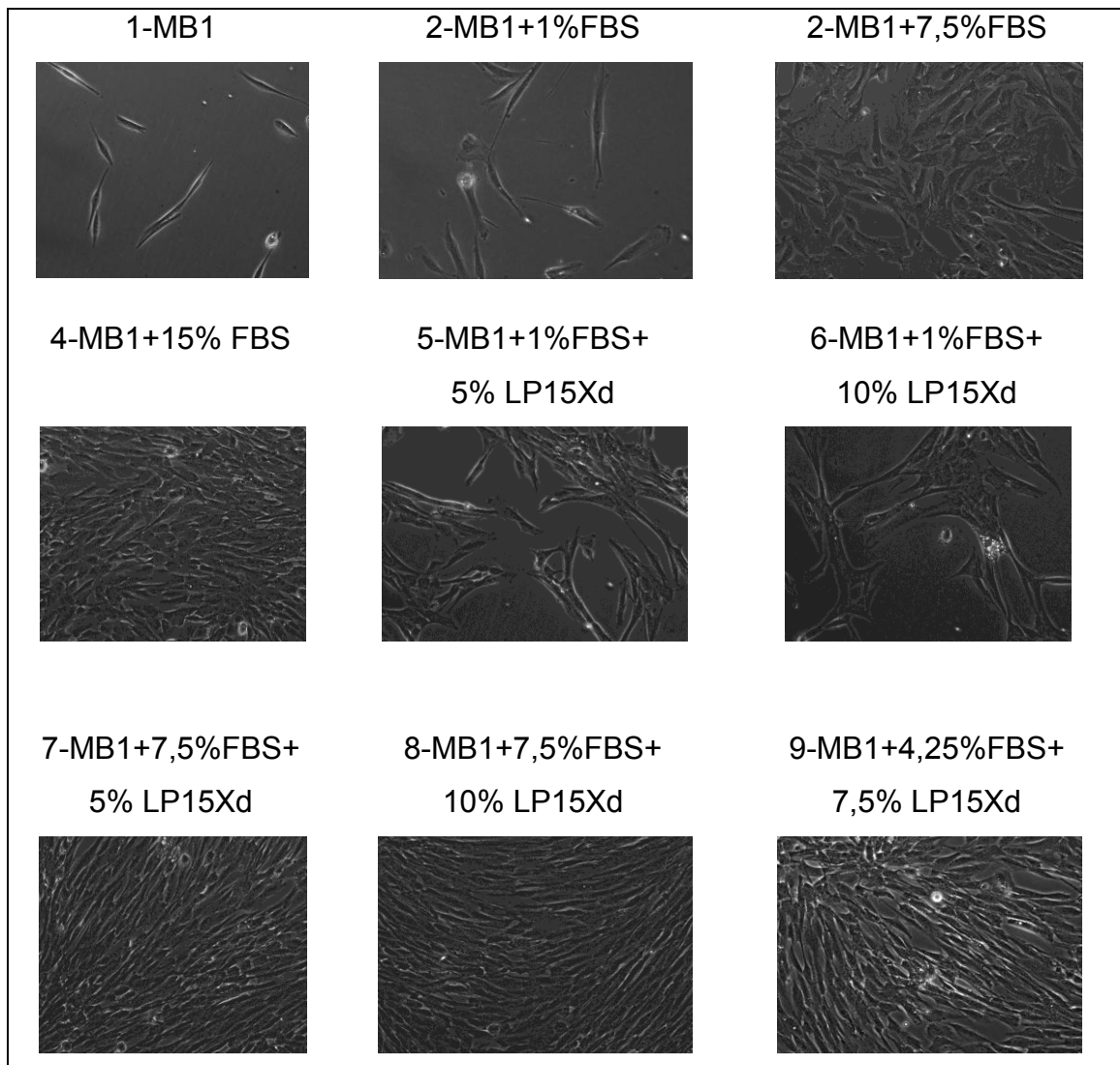


Figure 31: Effet du LP15Xd – plan factoriel complet; Microscopie 20X au jour 5.

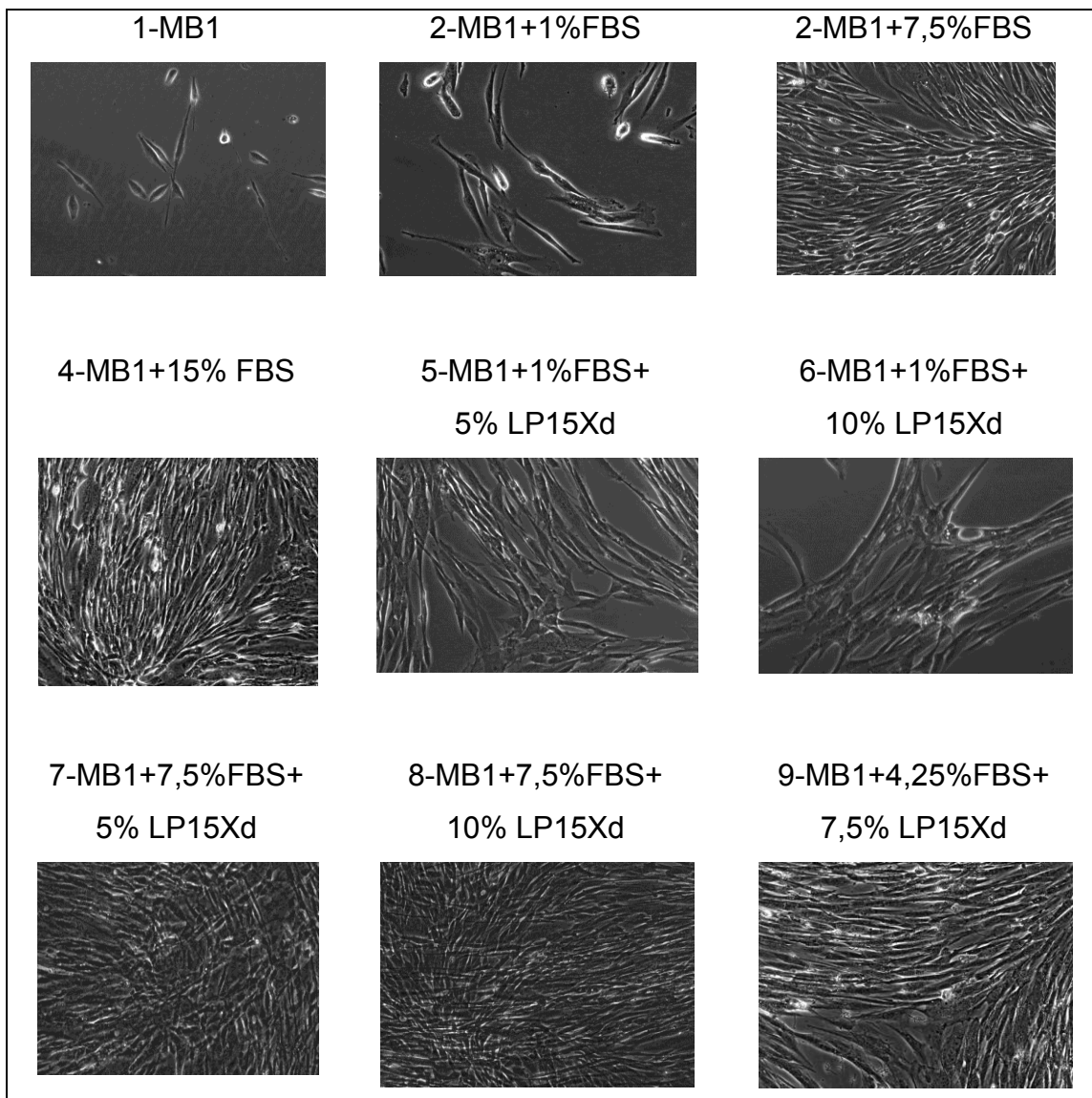


Figure 32: Effet du LP15Xd – plan factoriel complet; Microscopie 20X au jour 7.

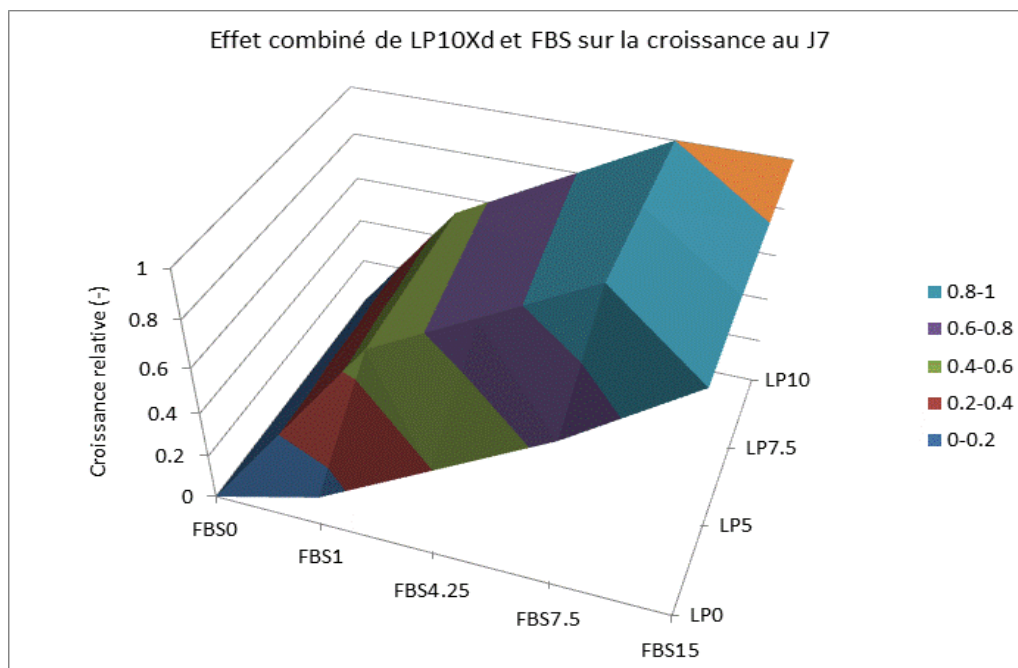


Figure 33: Effet combiné du colostrum LP15Xd et du FBS sur la croissance cellulaire (données de concentration cellulaire au jour 7, reportée sur une échelle relative).

4.5.4 Test de l'effet du LP15xd sur des myoblastes cultivées dans le milieu LOBSFM

Cette expérience avait pour but d'observer l'effet de l'ajout du colostrum bovin concentré et diafiltré (LP15Xd) au milieu sans sérum, le LOBSFM, conçu pour la croissance des myoblastes, duquel le FBS a été déjà éliminé. Plus spécifiquement, l'objectif de cette étude était de tester si le colostrum permettrait d'améliorer les performances du milieu LOBSFM et s'il pourrait régler, au moins partiellement, le problème que nous avons observé avec le LOBSFM, soit un changement de morphologie.

Différentes concentrations et combinaisons de LP15Xd ont alors été testées. Ces conditions ainsi que le ratio d'expansion cellulaire apparaissent au tableau 17 ainsi qu'aux figures 34 à 37.

Tableau 17 : Composition et croissance des myoblastes au jour 7 pour des mélanges de colostrum LP15Xd et du FBS

# Conditions	Milieu culture	% LP15Xd	% FBS	Ratio d'expansion au jour 7
1	MB1	-	-	-
2	MB1	-	15	22,19
3	MB1	5	7.5	19,38
4	LOBSFM	-	-	24,38
5	LOBSFM	2	-	0
6	LOBSFM	5	-	0
7	LOBSFM	10	-	0
8	LOBSFM	5	2	20,75

Remarque : (-) indique l'absence de la fraction.

D'après la figure 34, on observe que le milieu LOBSFM sans FBS (condition #4) assure une croissance des myoblastes équivalente à la croissance dans le milieu de base MB1 supplémenté avec 15 % FBS (contrôle positif, condition #2). Cependant, en comparant les résultats des expériences #5, #6 et #7, à des concentrations de LP15Xd 2 %, 5% et 10%, respectivement vs l'expérience #4 réalisée en LOBSFM sans LP15Xd, on observe que l'ajout du LP15Xd au LOBSFM a un effet nuisible sur la croissance des myoblastes et fait tomber la croissance cellulaire à zéro. Ces observations nous permettent de constater que l'ajout de colostrum LP15Xd au LOBSFM n'a aucun effet bénéfique sur l'amélioration des performances de ce milieu. Au contraire, l'ajout du LP15Xd a un effet néfaste sur la croissance des myoblastes et donc il n'y a aucun intérêt à suivre la morphologie des myoblastes. Donc l'ajout du LP15Xd au milieu LOBSFM ne permet pas alors d'atteindre l'objectif visé.

À partir de ces résultats, on confirme que la présence de FBS, même dans un milieu conçu pour supporter la croissance des myoblastes sans FBS, reste requise pour neutraliser l'effet toxique du LP15Xd.

Par ailleurs, la condition #8, où 2% de FBS est rajouté au LOBSFM contenant 5% de LP15X permet de constater que l'ajout de FBS peut neutraliser l'effet toxique du LP15Xd, même en LOBSFM. D'ailleurs, on observe que l'ajout de 2 % FBS combiné avec 5 % LP15Xd a permis de rétablir complètement la croissance cellulaire (condition #8 vs #6). En outre, en observant les photos dans la figure 37 des conditions #2, #4 et #8, on remarque que les myoblastes cultivées avec 15 % FBS, condition #2, adoptent une morphologie arrondie. Tandis que les cellules cultivées en LOBSFM seul, condition #4, adoptent une morphologie allongée. Mais en comparant la photo de la condition #8, où les cellules sont cultivées avec du LOBSFM supplémenté avec 2% FBS+ 5% Lp15Xd, on remarque que leur morphologie cellulaire se rapproche plus de la condition #4 que la condition #2. Donc l'ajout du LP15Xd combiné avec du FBS ne semble pas avoir d'effet positif sur la morphologie cellulaire, i.e. ne permet pas en LOBSFM de retrouver la morphologie observée dans le milieu standard contenant 15% FBS.

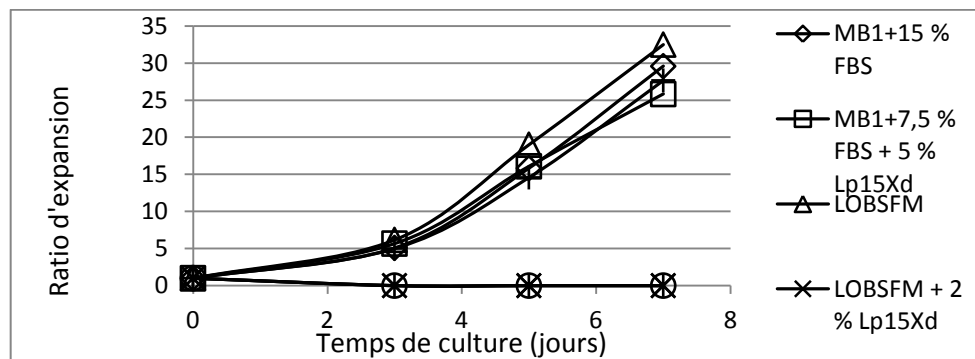


Figure 34: Effet du LP15Xd en milieu conçu pour la culture sans sérum; Profil de croissance cellulaire des myoblastes cultivés dans le milieu LOBSFM durant 7 jours de culture.

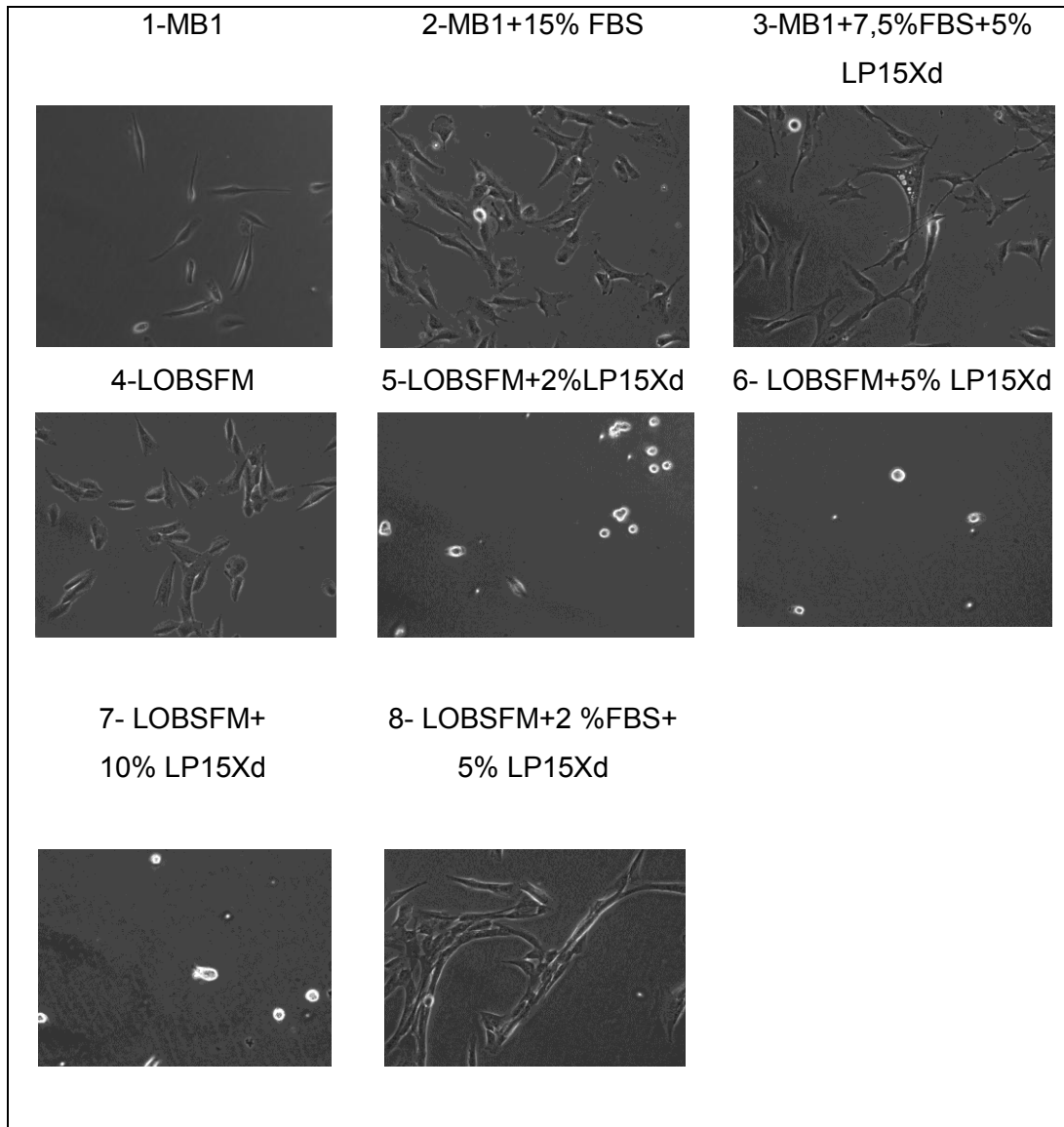


Figure 35: Effet du LP15Xd; Microscopie 20X au jour 3.

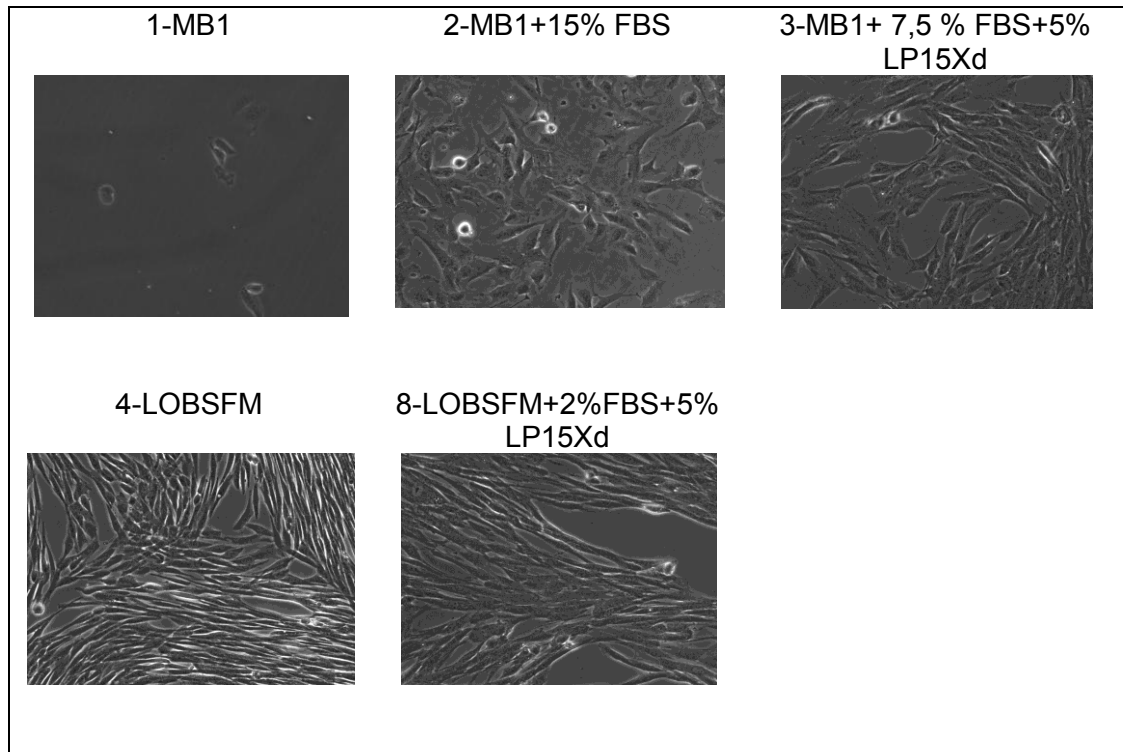


Figure 36: Effet du LP15Xd; Microscopie 20X au jour 5.

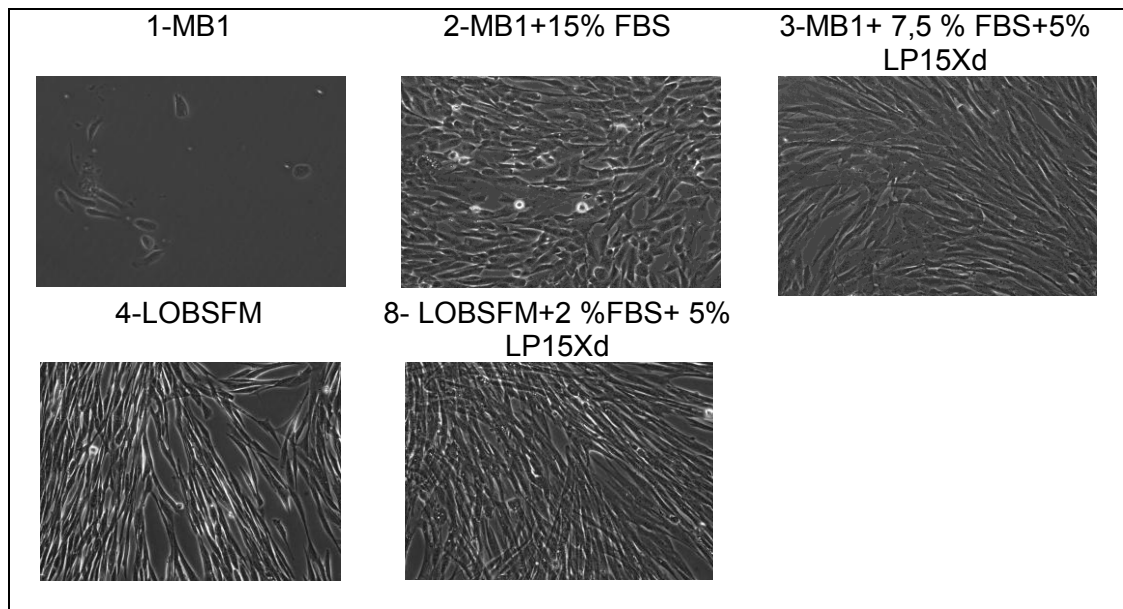


Figure 37: Effet du LP15Xd; Microscopie 20X au jour 7.

Chapitre 5. Conclusion et Perspectives

Au cours de ce travail, trois techniques de fractionnement du FBS ont été mises au point et appliquées. Il s'agit du procédé d'électrodialyse sur membrane d'ultrafiltration (EDUF), ainsi que les méthodes affinitaires basées soit sur une librairie d'hexapeptides (ProteoMiner^{MD}, Bio-Rad), ou l'affinité du Cibacron bleu F3G-A pour l'albumine. Les fractions générées par chaque méthode ont été analysées (teneur en protéines, gel d'électrophorèse), puis ont été diafiltrées dans des cartouches centrifugeables de 3 kDa pour être testées pour leur effet sur l'expansion de myoblastes humaines.

Les résultats de fractionnement du FBS par les différentes méthodes de fractionnement ont montré que le fractionnement a été réalisé avec succès. Toutefois, les fractions obtenues, même concentrées par ultrafiltration sur une membrane de 3 kDa, n'ont pas montré d'effet stimulant sur la croissance des myoblastes. Pour comprendre cette problématique, du FBS brut a été diafiltré puis testé pour son effet sur l'expansion des myoblastes. Les résultats obtenus montrent que, utilisé seul, le rétentat de FBS diafiltré ne permet pas une croissance satisfaisante des myoblastes. Ceci suggèrent que la diafiltration sur une membrane de petite porosité (3 kDa) élimine malgré tout des molécules utiles à la croissance cellulaire et que le test des fractions obtenues par chacune des méthodes de fractionnement appliquée est affecté par cette procédure. Jusqu'à présent, il est impossible de tester les fractions obtenues de chaque méthode de fractionnement appliquée tant qu'un autre moyen de concentration et de remplacement de tampon n'aura pas été identifié, ou que les petites molécules utiles qui ont été éliminées par la diafiltration puissent être identifiées et rajoutées indépendamment des sels à haute concentration qui sont utilisés pour le fractionnement en amont.

À partir des résultats de ces trois méthodes appliquées, il est clair que le fractionnement spécifique des protéines à partir de FBS est extrêmement complexe. Il a été difficile de déterminer la méthode la plus efficace pour fractionner le FBS, car chaque méthode a ses avantages et ses inconvénients.

En ce qui concerne le colostrum bovin, des travaux ont également mené à la caractérisation de la formulation LP1.5 quant à son contenu en protéines, en matières sèches, en matières de masse moléculaire inférieure à 3 kDa ainsi qu'à l'identification de ses protéines majeures.

Par la suite, des essais sur la culture des myoblastes ont été réalisés avec ce supplément traité de différentes façons (brut (LP1.5), concentré 10 fois (LP10X), et concentré 15X puis rincé par un facteur 225 avec du PBS (diafiltré) (LP15Xd). Ces essais ont montré qu'il était préférable de concentrer et de diafiltrer le LP1.5 pour qu'il soit efficace. Le LP15Xd a montré un effet important sur la croissance des myoblastes, en présence d'une concentration réduite en FBS. En effet, un ajout de 5% de LP15Xd a permis d'atteindre 47% , 71% et 95% de la croissance maximale obtenue avec le contrôle positif (15% FBS), dans des concentrations de 1%, 4,25% et 7,5% de FBS, respectivement. Fait important à noter, la diafiltration sur membrane de 3kDa ne semble pas avoir eu le même effet sur le LP1.5 que sur le FBS puisque l'activité de cet additif a été maintenue malgré cette ultrafiltration.

Finalement, le LP15Xd a été testé pour son effet sur l'amélioration des performances du milieu LOBSFM, duquel le FBS a déjà été éliminé. Ces essais ont montré que l'ajout du LP15Xd seul au LOBSFM a en fait un effet toxique sur les myoblastes.

Par ailleurs, l'ajout combiné de 5% LP15Xd et de 2% FBS permettait d'éliminer cet effet toxique, mais sans avantage supplémentaire ni sur le niveau ou la

vitesse de croissance des myoblastes, ni en ce qui concerne leur morphologie, par rapport au LOBSFM seul.

Dans le futur, d'autres travaux peuvent être envisagés afin de faire avancer ce projet et se rapprocher des objectifs prévus. Dans un premier temps, il serait intéressant de poursuivre les travaux sur les méthodes testées en changeant les conditions opératoires appliquées dans les trois techniques de fractionnement du FBS. Par exemple, en changeant les tampons de liaison ou d'éluion dans les méthodes de fractionnement par affinité, ou bien en testant d'autres valeurs de pH dans le procédé d'EDUF.

Dans un deuxième temps, un procédé d'ultrafiltration, sur une membrane dont la porosité est inférieure à 3 kDa pourrait être appliqué aux fractions de FBS afin de tester leur effet sur la croissance des myoblastes seules. À notre connaissance il existe très peu de produits de dialyse ou d'ultrafiltration dans cette gamme de taille de pores. Une alternative serait d'ajouter les petites molécules utiles, telles possiblement des acides aminés, qui auraient pu être perdues lors de cette ultrafiltration à 3kDa.

En outre, d'autres méthodes de fractionnement de FBS tel que, la séparation par exclusion de taille, l'ultrafiltration tangentielle sur des membranes de plus grande taille de pores que 3 kDa (50, 100, 150 kDa et plus) et la précipitation au sulfate d'ammonium pourraient être testées dans l'espoir d'identifier des facteurs définis qui permettraient d'une part de stimuler la croissance de myoblastes fonctionnelles et d'autre part d'améliorer les performances du milieu sans sérum déjà développé, soit le LOBSFM pour ce qui est de la morphologie cellulaire et la fonctionnalité lors des test *in vivo*.

Références bibliographiques

- Adkins, J. N., S. M. Varnum, K. J. Auberry, R. J. Moore, N. H. Angell, R. D. Smith, D. L. Springer et J. G. Pounds. 2002. « Toward a human blood serum proteome: analysis by multidimensional separation coupled with mass spectrometry ». *Mol Cell Proteomics*, vol. 1, n° 12, p. 947-55.
- Anderson, N. L., et A. Norman G. 2002. « The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects ». *Mol Cell Proteomics*, vol. 1, n° 11, p. 845-67.
- Anderson, N. L., Malu P, Rembert P, Tina G, Radhakrishna S., Thomas P., Timothy D., Joshua N., . 2004. « The Human Plasma Proteome: A Nonredundant List Developed by Combination of Four Separate Sources ». *Molecular & Cellular Proteomics*, vol. 3, n° 4, p. 311-326.
- Bandow, J. E. 2010. « Comparison of protein enrichment strategies for proteome analysis of plasma ». *Proteomics*, vol. 10, n° 7, p. 1416-25.
- Barbosa, L. R., M. G. Ortore, F. Spinozzi, P. Mariani, S. Bernstorff et R. Itri. 2010. « The importance of protein-protein interactions on the pH-induced conformational changes of bovine serum albumin: a small-angle X-ray scattering study ». *Biophys J*, vol. 98, n° 1, p. 147-57.
- Bazinet, L., et L. Firdaous. 2009. « Membrane processes and devices for separation of bioactive peptides ». *Recent Pat Biotechnol*, vol. 3, n° 1, p. 61-72.
- Bogdanovich, S., K. J. Perkins., T. B. Krag et T. S. Khurana. 2004. « Therapeutics for Duchenne muscular dystrophy: current approaches and future directions ». *Journal of Molecular Medicine*, vol. 82, n° 2, p. 102-115.
- Boschetti, E., et P. G. Righetti. 2008. « Hexapeptide combinatorial ligand libraries: the march for the detection of the low-abundance proteome continues ». *Biotechniques*, vol. 44, n° 5, p. 663-5.
- Colantonio, D. A., C. Dunkinson, D. E. Bovenkamp et J. E. Van Eyk. 2005. « Effective removal of albumin from serum ». *Proteomics*, vol. 5, n° 15, p. 3831-5.

- Denizli, A., et E. Pişkin. 2001. « Dye-ligand affinity systems ». *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, vol. 49, n° 1–3, p. 391-416.
- Even, M. S., C. B. Sandusky et N. D. Barnard. 2006. « Serum-free hybridoma culture: ethical, scientific and safety considerations ». *Trends Biotechnol*, vol. 24, n° 3, p. 105-8.
- Faulkner, S., G. Elia, M. Hillard, P. O'Boyle, M. Dunn et D. Morris. 2011. « Immunodepletion of albumin and immunoglobulin G from bovine plasma ». *Proteomics*, vol. 11, n° 11, p. 2329-35.
- Ge, S., K. Kojio, A. Takahara et T. Kajiyama. 1998. « Bovine serum albumin adsorption onto immobilized organotrichlorosilane surface: influence of the phase separation on protein adsorption patterns ». *J Biomater Sci Polym Ed*, vol. 9, n° 2, p. 131-50.
- Goyenvalle, A., J. T. Seto, K. E. Davies et J. Chamberlain. 2011. « Therapeutic approaches to muscular dystrophy ». *Human Molecular Genetics*.
- Ghosh R., 2006 Principles of Bioseparation Engineering, World Scientific Publishing Pte Ltd. ISBN 981-256-892-1 (October 2006)
- Guerrier, L., P. G. Righetti et E. Boschetti. 2008a. « Reduction of dynamic protein concentration range of biological extracts for the discovery of low-abundance proteins by means of hexapeptide ligand library ». *Nat Protoc*, vol. 3, n° 5, p. 883-90.
- Guerrier, L., P. G. Righetti et E. Boschetti. 2008b. « Reduction of dynamic protein concentration range of biological extracts for the discovery of low-abundance proteins by means of hexapeptide ligand library ». *Nat. Protocols*, vol. 3, n° 5, p. 883-890.
- Ham, R. G., J. A. St Clair, C. Webster et H. M. Blau. 1988. « Improved media for normal human muscle satellite cells: serum-free clonal growth and enhanced growth with low serum ». *In Vitro Cell Dev Biol*, vol. 24, n° 8, p. 833-44.

- Hoffman, E. P., R. H. Brown, et L. M. Kunkel. 1987. « Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus ». *Cell*, vol. 51, n° 6, p. 919-28.
- Jochems, C. E., J. B. van der Valk, F. R. Stafleu et V. Baumans. 2002. « The use of fetal bovine serum: ethical or scientific problem? ». *Altern Lab Anim*, vol. 30, n° 2, p. 219-27.
- Kaplitt, M. G., P. Leone, R. J. Samulski, X. Xiao, D. W. Pfaff, K. L. O'Malley et M. J. Durning. 1994. « Long-term gene expression and phenotypic correction using adeno-associated virus vectors in the mammalian brain ». *Nat Genet*, vol. 8, n° 2, p. 148-54.
- Kongraksawech, T., P. V. Landaverde, J. H. Ruelas et J. A. Torres. 2007. « Ionic strength and pH effects on optical thermographs for bovine serum albumin (BSA) ». *CYTA-Journal of Food*, vol. 5, n° 4, p. 259-264.
- Konieczny, P., K. Swiderski et J. S. Chamberlain. 2013. « Gene and cell-mediated therapies for muscular dystrophy ». *Muscle Nerve*, vol. 47, n° 5, p. 649-63.
- Kuralay, F., E. Yilmaz, L. Uzun et A. Denizli. 2013. « Cibacron Blue F3GA modified disposable pencil graphite electrode for the investigation of affinity binding to bovine serum albumin ». *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 110, n° 0, p. 270-274.
- Madureira, A. R., C. I. Pereira, A. M. P. Gomes, M. E. Pintado et F. X. Malcata. 2007. « Bovine whey proteins – Overview on their main biological properties ». *Food Research International*, vol. 40, n° 10, p. 1197-1211.
- Malik, V., R. K. Louise et J. R. Mendell. 2012. « Emerging drugs for Duchenne muscular dystrophy ». *Expert Opin Emerg Drugs*, vol. 17, n° 2, p. 261-77.
- Mandal, H. K., A. Kundu, S. Balti et A. Mahapatra. 2012. « Kinetic investigation on the oxidation of tris(1,10-phenanthroline)iron(II) by oxone: the effect of BSA-SDS interaction ». *J Colloid Interface Sci*, vol. 378, n° 1, p. 110-7.
- Mendell, J. R., K. Campbell, L. Rodino-Klapac, Z. Sahenk, C. Shilling, S. Lewis, D. Bowles, S. Gray, C. Li, G. Galloway, V. Malik, B. Coley, K. R. Clark, J. Li, X. Xiao, J. Samulski, S. W. McPhee, R. J. Samulski et C. M. Walker.

2010. « Dystrophin immunity in Duchenne's muscular dystrophy ». *N Engl J Med*, vol. 363, n° 15, p. 1429-37.

Naik, P. N., S. A. Chimatadar et S. T. Nandibewoor. 2010. « Interaction between a potent corticosteroid drug – Dexamethasone with bovine serum albumin and human serum albumin: A fluorescence quenching and fourier transformation infrared spectroscopy study ». *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, vol. 100, n° 3, p. 147-159.

Ndiaye, N., 2009. « Étude de la séparation de la lactoferrine bovine par électrodialyse avec membrane d'ultrafiltration » www.theses.ulaval.ca/2009/26581/26581.

Odabaşı, M., et A. Denizli. 2004. « Cibacron Blue F3GA-attached magnetic poly(2-hydroxyethyl methacrylate) beads for human serum albumin adsorption ». *Polymer International*, vol. 53, n° 3, p. 332-338.

Parent, V. A., A. Garnier et J. P. Tremblay , 2009. Culture medium from Myoblasts, precursors thereof and derivatives thereof. Patent number CA2009/001342.

Partridge, T. A., J. E. Morgan, G. R. Coulton, E. P. Hoffman et L. M. Kunkel. 1989. « Conversion of mdx myofibres from dystrophin-negative to - positive by injection of normal myoblasts ». *Nature*, vol. 337, n° 6203, p. 176-9.

Peault, B., M. Rudnicki, Y. Torrente, G. Cossu, J. P. Tremblay, T. Partridge, E. Gussoni, L. M. Kunkel et J. Huard. 2007. « Stem and progenitor cells in skeletal muscle development, maintenance, and therapy ». *Mol Ther*, vol. 15, n° 5, p. 867-77.

Perteau, M., et S. Salzberg. 2010. « Between a chicken and a grape: estimating the number of human genes ». *Genome Biology*, vol. 11, n° 5, p. 206.

Playford, R. J., C. E. Macdonald et W. S. Johnson. 2000. « Colostrum and milk-derived peptide growth factors for the treatment of gastrointestinal disorders ». *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 72, n° 1, p. 5-14.

- Righetti, P. G., et E. Boschetti. 2013. « Chapter 1 - Introducing Low-Abundance Species in Proteome Analysis ». In *Low-abundance Proteome Discovery*, sous la dir. de Righetti, Pier Giorgio, et Egisto Boschetti. p. 1-11. Boston: Elsevier.
- Righetti, P. G., A. Castagna, B. Herbert, F. Reymond et J. S. Rossier. 2003. « Prefractionation techniques in proteome analysis ». *Proteomics*, vol. 3, n° 8, p. 1397-1407.
- Rodino-Klapac, L. R., J. R. Mendell et Z. Sahenk. 2013. « Update on the treatment of Duchenne muscular dystrophy ». *Curr Neurol Neurosci Rep*, vol. 13, n° 3, p. 332.
- Robinson, N. E., et A. B. Robinson. 2008. « Use of Merrifield solid phase peptide synthesis in investigations of biological deamidation of peptides and proteins ». *Biopolymers*, vol. 90, n° 3, p. 297-306.
- Skuk, D., M. Goulet, B. Roy, P. Chapdelaine, J. P. Bouchard, R. Roy, F. J. Dugre, M. Sylvain, J. G. Lachance, L. Deschenes, H. Senay et J. P. Tremblay. 2006. « Dystrophin expression in muscles of duchenne muscular dystrophy patients after high-density injections of normal myogenic cells ». *J Neuropathol Exp Neurol*, vol. 65, n° 4, p. 371-86.
- Skuk, D., B. Roy, M. Goulet, P. Chapdelaine, J. P. Bouchard, R. Roy, F. J. Dugre, J. G. Lachance, L. Deschenes, S. Helene, M. Sylvain et J. P. Tremblay. 2004. « Dystrophin expression in myofibers of Duchenne muscular dystrophy patients following intramuscular injections of normal myogenic cells ». *Mol Ther*, vol. 9, n° 3, p. 475-82.
- Thapa, B. R. 2005. « Health factors in colostrum ». *Indian J Pediatr*, vol. 72, n° 7, p. 579-81.
- Tirumalai, R. S., K. C. Chan, D. A. Prieto, H. J. Issaq, T. P. Conrads et T. D. Veenstra. 2003. « Characterization of the Low Molecular Weight Human Serum Proteome ». *Molecular & Cellular Proteomics*, vol. 2, n° 10, p. 1096-1103.

- Tremblay, J. P., D. Skuk, B. Palmieri et D. M. Rothstein. 2009. « A case for immunosuppression for myoblast transplantation in duchenne muscular dystrophy ». *Mol Ther*, vol. 17, n° 7, p. 1122-4.
- Tripathi, V., et B. Vashishtha. 2006. « Bioactive Compounds of Colostrum and its Application ». *Food Reviews International*, vol. 22, no 3, p. 225-244.
- Tüzmen, N., L. Uzun et A. Denizli. 2007. « Immobilized Metal Affinity Adsorption for Antibody Depletion from Human Serum with Monosize Beads ». *Industrial & Engineering Chemistry Research*, vol. 46, n° 23, p. 7802-7810.
- Uzun, L., H. Yavuz, R. Say, A. Ersöz et A. Denizli. 2004. « Poly(ethylene dimethacrylate-glycidyl methacrylate) Monolith as a Stationary Phase in Dye-Affinity Chromatography ». *Industrial & Engineering Chemistry Research*, vol. 43, n° 20, p. 6507-6513.
- Van der Valk, J., D. Mellor, R. Brands, R. Fischer, F. Gruber, G. Gstraunthaler, L. Hellebrekers, J. Hyllner, F. H. Jonker, P. Prieto, M. Thalen et V. Baumans. 2004. « The humane collection of fetal bovine serum and possibilities for serum-free cell and tissue culture ». *Toxicol In Vitro*, vol. 18, n° 1, p. 1-12.
- Wang, B., J. Li et X. Xiao. 2000. « Adeno-associated virus vector carrying human minidystrophin genes effectively ameliorates muscular dystrophy in mdx mouse model ». *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 97, n° 25, p. 13714-13719.
- Wong-Brenda L. Y., et C. Christopher. 2002. « Corticosteroids in Duchenne Muscular Dystrophy: A Reappraisal ». *Journal of Child Neurology*, vol. 17, n° 3, p. 183-190.
- Zhao, X., G. Li et S. Liang. 2013. « Several Affinity Tags Commonly Used in Chromatographic Purification ». *J Anal Methods Chem*, vol. 2013, p. 581093.

Annexes

Annexe 1: Chromatogrammes de fractionnement du FBS avec la colonne d'affinité Hitrap Blue High Performance.

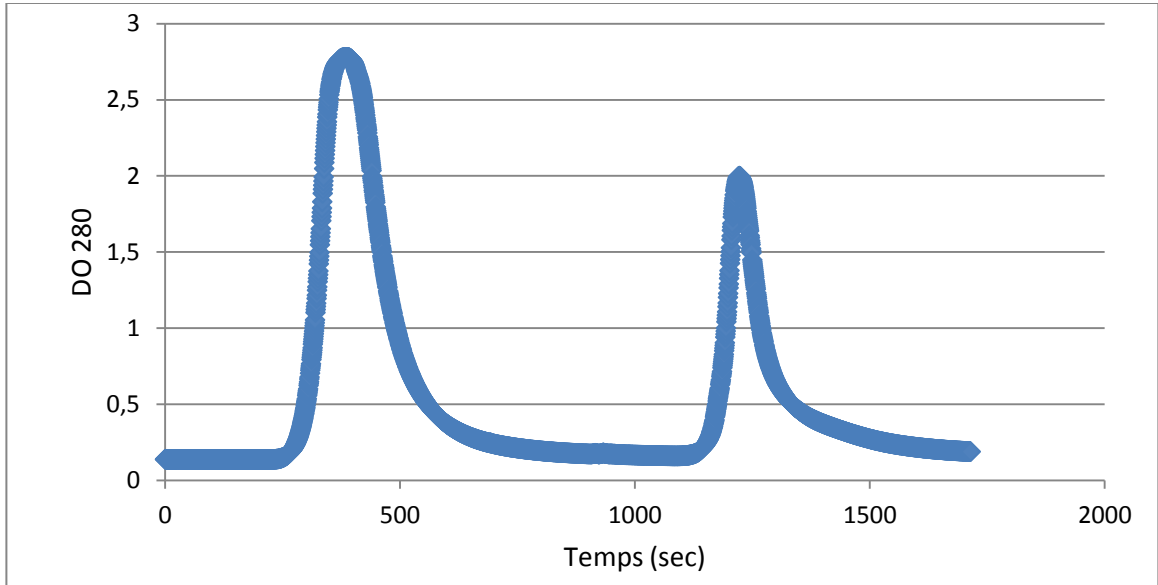


Figure 38: Chromatogramme de fractionnement de 1 ml du FBS par la colonne d'affinité Hitrap Blue HP avec un débit 1,5 ml/min.

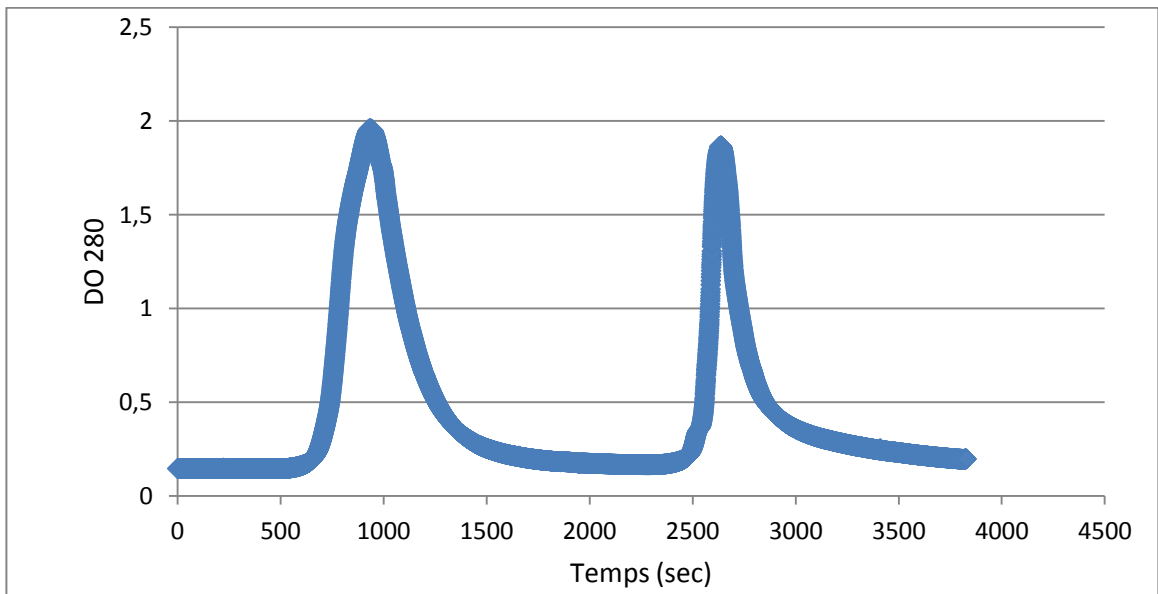


Figure 39: Chromatogramme de fractionnement de 0, 5 ml du FBS par la colonne d'affinité Hitrap Blue HP avec un débit 0,5 ml/min.

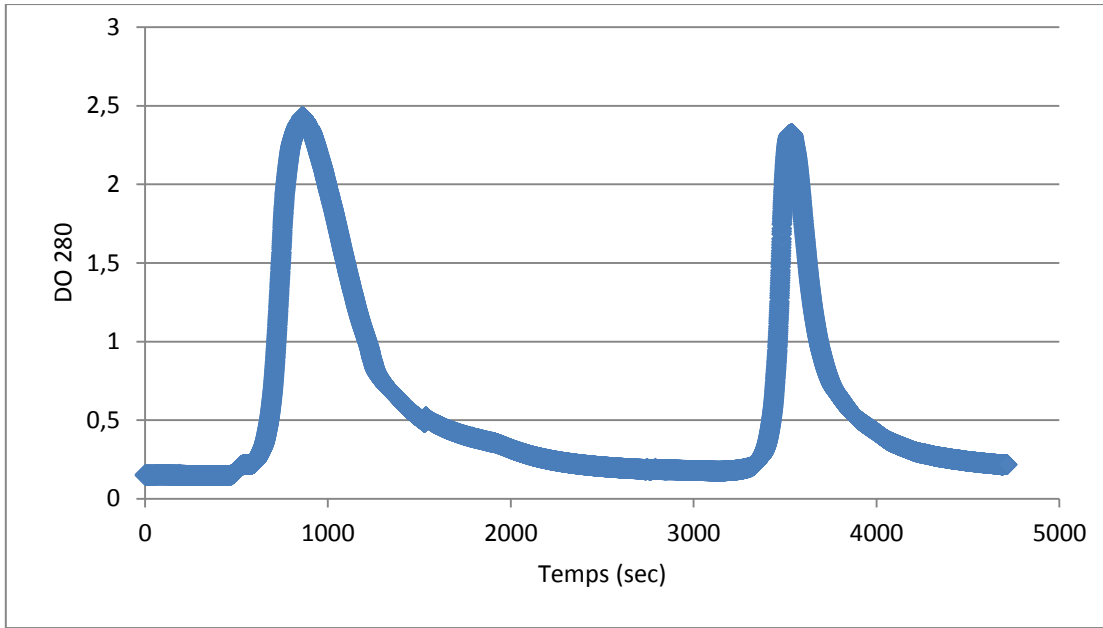


Figure 40: Chromatogramme de fractionnement de 1ml du FBS par la colonne d'affinité Hitrap Blue HP avec un débit 0,5 ml/min.

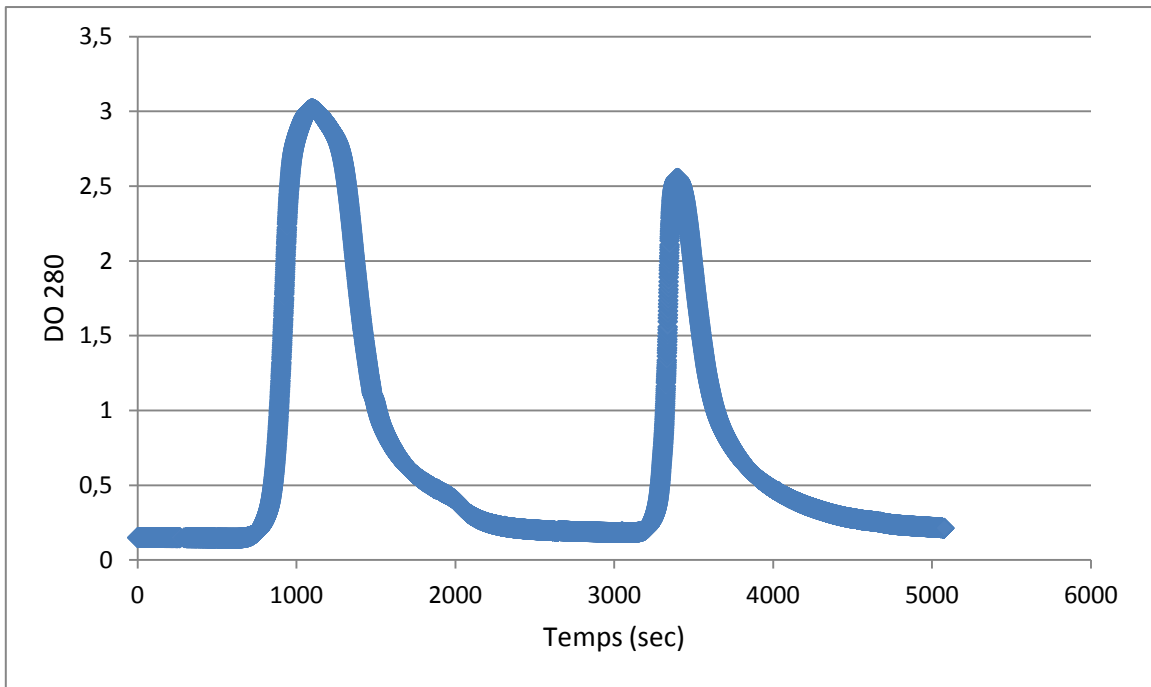


Figure 41: Chromatogramme de fractionnement de 2 ml du FBS par la colonne d'affinité Hitrap Blue HP avec un débit 0,5 ml/min.

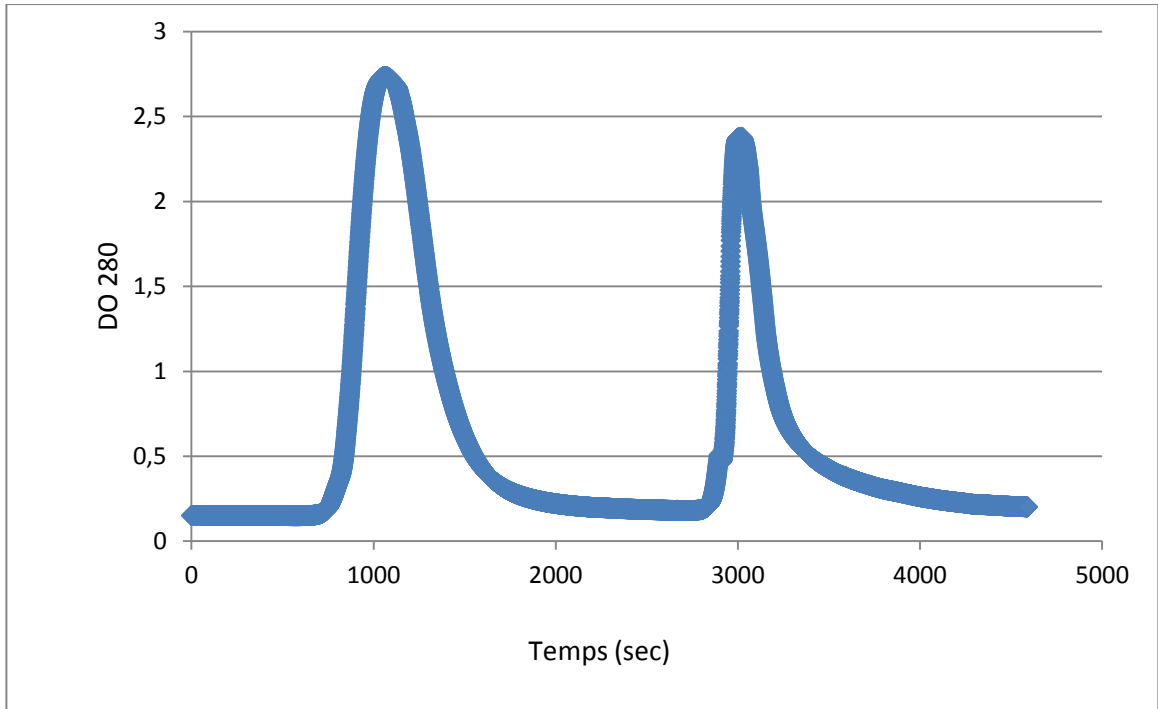


Figure 42: Chromatogramme de fractionnement de 1ml du FBS dilué 1:1 par la colonne d'affinité Hitrap Blue HP avec un débit 0,5 ml/min.

Annexe 2: Détermination de la teneur en matière sèche du colostrum bovin

LP1.5

Tube	Avant séchage		Après séchage (6 h)					Matière sèche (g/L)
	Masse tube vide (g)	Masse tube rempli (g)	Masse tube vide (g)	Masse tube rempli (g)	Masse de la matière hydratée (g)	Matière sèche (g/2ml)	% de la matière sèche	
1	0,993	3,0132		1,1896	2,0202	0,1966	9,732	96,92
2	1,0234	3,0164		1,2177	1,993	0,1943	9,749	
3	1,0124	3,0055		1,2054	1,9931	0,193	9,683	
4	1,0029	2,9879		1,1956	1,985	0,1927	9,708	
5	1,0169	2,9903		1,2095	1,9734	0,1926	9,760	
6	0,9933		0,9936					
7	1,0085		1,009					
8	1,003		1,0036					
9	0,98		0,9803					
10	1,0156		1,015					

Après séchage (12 h)				
Masse tube vide	Masse tube rempli	Matière sèche (g/2ml)	% de la matière sèche	Matière sèche (g/L)
	1,1892	0,1962	9,712	96,7
	1,2169	0,1935	9,709	
	1,2053	0,1929	9,678	
	1,1952	0,1923	9,688	
	1,209	0,1921	9,734	
0,9947				
1,0093				
1,004				
0,981				
1,0166				

Annexe 3: Détermination de la teneur en matière sèche du colostrum bovin LP1.5 concentré

Tube	Avant séchage		Après séchage (6 h)					Matière sèche (g/L)
	Masse tube vide (g)	Masse tube rempli (g)	Masse tube vide (g)	Masse tube rempli (g)	Masse de la matière hydratée (g)	Matière sèche (g/2ml)	% de la matière sèche	
1	0,9802	2,985		1,3205	2,0048	0,3403	16,974	151,88
2	1,0028	3,0037		1,2825	2,0009	0,2797	13,979	
3	1,0085	2,9814		1,3385	1,9729	0,33	16,727	
4	1,0098	3,0205		1,3034	2,0107	0,2936	14,602	
5	1,0153	3,0134		1,2905	1,9981	0,2752	13,773	
6	1,0096		1,0095					
7	1,0125		1,0125					
8	0,9932		0,9928					
9	1,0156		1,0157					
10	0,9932		0,9933					

Après séchage (12 h)				Matière sèche (g/L)
Masse tube vide	Masse tube rempli	Matière sèche (g/2ml)	% de la matière sèche	
	1,2985	0,3183	15,877	144,05
	1,2693	0,2665	13,319	
	1,3225	0,314	15,916	
	1,291	0,2812	13,985	
	1,2758	0,2605	13,037	
0,9947				
1,0093				
1,004				
0,981				
1,0166				