



Université de Sherbrooke

**Influence de la rigidité du microenvironnement sur les cellules progénitrices  
myogéniques du muscle squelettique**

Par  
André-Jean Rouleau  
Programme de Biologie Cellulaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé  
en vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M.Sc.)  
en Biologie Cellulaire

Sherbrooke, Québec, Canada  
Mars, 2016

Membres du jury d'évaluation  
Pr. Guillaume Grenier, Ph.D., Département de Chirurgie  
Pr. Fernand-Pierre Gendron, Ph.D., Département d'Anatomie et Biologie Cellulaire  
Pre. Julie Fradette, Ph.D., Département de Chirurgie, Faculté de Médecine, Université  
Laval

© André-Jean Rouleau, 2016

# 1 RÉSUMÉ

## **Influence de la rigidité du microenvironnement sur les cellules progénitrices myogéniques du muscle squelettique**

Par

André-Jean Rouleau

Programme de Biologie Cellulaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme Maître ès Sciences (M.Sc.) en Biologie Cellulaire, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

La matrice extracellulaire (MEC) subit plusieurs modifications au cours du vieillissement, ce qui altère ses propriétés biomécaniques. Les cellules responsables de la régénération de la portion myogénique du muscle sont les cellules satellites, qui, une fois activées, sont appelées les cellules progénitrices myogéniques (CPM). La rigidité du muscle, influence le devenir des CPM. La capacité régénérative du muscle squelettique diminue lors du vieillissement. Nous avons posé l'hypothèse selon laquelle la rigidité observée dans le tissu âgé pourrait nuire à la capacité régénérative des CPM. Nous avons tout d'abord validé les modifications subies par la MEC suite au vieillissement en les comparant au tissu adulte. Les résultats montrent une augmentation de la quantité de collagènes et de réticulation non enzymatique. En plus, une augmentation de la rigidité du muscle et des fibres individualisées a été observée par microscopie à force atomique (AFM). L'équipe s'est ensuite intéressée à leur activité myogénique dans un modèle de fibres musculaires en culture (*ex vivo*). Nous avons observé une diminution du nombre de cellules myogéniques sur les fibres de tissus âgés, comparativement aux tissus adultes. Nous avons montré que les proportions de cellules quiescentes sont plus élevées sur des fibres adultes suite à l'isolement et que les proportions de cellules prolifératives et en voie de différenciation sont plus élevées sur les fibres âgées. De plus, sur des fibres endommagées gardées en culture six jours, nous avons observé que les proportions de cellules prolifératives sont plus élevées sur les fibres adultes et que celles des cellules en voie de différenciation sont plus élevées sur les fibres âgées. Enfin, nous avons observé l'activité myogénique des CPM ainsi que l'impact de la rigidité en culture (*in vitro*). Nous n'avons observé aucune différence des capacités de prolifération et de différenciation des myoblastes adultes et âgés. En terminant, nos recherches ont montré qu'une rigidité de 2.0 kPa favorise un état prolifératif tandis qu'une rigidité de 18 kPa stimule plutôt l'engagement vers la différenciation. Ces résultats suggèrent que la rigidité peut être une cause de la diminution du potentiel régénératif du muscle vieillissant. En résumé, ces travaux soulignent l'importance de l'augmentation de la rigidité du microenvironnement sur les CPM comme cause de la diminution du potentiel de régénération du muscle vieillissant.

Mots clés : Cellules progénitrices myogéniques, Cellules satellites, Mécanotransduction, Muscle squelettique, Microscopie à force atomique, Prolifération, Rigidité

*À ma famille et mes amis,  
qui ont su appuyer et encourager  
ma soif de savoir*

## 2 TABLE DES MATIÈRES

<b>1</b>	<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>II</b>
<b>2</b>	<b>TABLE DES MATIÈRES.....</b>	<b>IV</b>
<b>3</b>	<b>Liste des illustrations.....</b>	<b>VII</b>
<b>4</b>	<b>Liste des tableaux.....</b>	<b>VIII</b>
<b>5</b>	<b>Liste des annexes.....</b>	<b>IX</b>
<b>6</b>	<b>Liste des abréviations.....</b>	<b>X</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>13</b>
1.1	LE MUSCLE SQUELETTIQUE.....	13
1.1.1	<i>Structure et fonctions.....</i>	13
1.1.2	<i>La portion stromale.....</i>	15
1.1.2.1	La matrice extracellulaire.....	15
1.1.2.2	Les cellules stromales résidentes du muscle (mrSC).....	16
1.1.3	<i>La portion myogénique.....</i>	19
1.1.3.1	Les fibres musculaires.....	19
1.1.3.2	Les cellules satellites.....	21
1.2	LE VIEILLISSEMENT DU MUSCLE.....	24
1.2.1	<i>Principales voies de signalisation.....</i>	26
1.2.2	<i>La mécanotransduction.....</i>	30
1.2.3	<i>Les intégrines et leurs communications croisées.....</i>	33
1.2.4	<i>La composition de la matrice extracellulaire.....</i>	34
1.2.5	<i>Les propriétés biomécaniques de la matrice extracellulaire.....</i>	34
1.3	ÉTUDE DE LA RIGIDITÉ.....	35
1.3.1	<i>Les techniques d'élaboration de matrices de rigidité variables.....</i>	36
1.3.1.1	Hydrogels de polyacrylamides.....	36
1.3.1.2	Autres types de gels.....	36
1.3.2	<i>Les techniques de mesure de rigidité.....</i>	37
1.3.2.1	Microscopie à force atomique (AFM).....	37
1.4	HYPOTHÈSE DE TRAVAIL ET OBJECTIFS DE RECHERCHE.....	38
<b>2</b>	<b>MATÉRIEL ET MÉTHODES.....</b>	<b>40</b>
2.1	SOURIS ET ISOLEMENT DES MUSCLES SQUELETTIQUES.....	40

2.2	HISTOLOGIE ET COLORATION HISTOLOGIQUE.....	40
2.3	IMMUNOMARQUAGES .....	40
2.4	QUANTIFICATION DU COLLAGÈNE DU MUSCLE SQUELETTIQUE .....	42
2.5	QUANTIFICATION DES PRODUITS DE GLYCATION AVANCÉ (AGE) DU MUSCLE SQUELETTIQUE ...	42
2.6	ISOLEMENT ET CULTURE DES FIBRES MUSCULAIRES .....	43
2.7	ISOLEMENT, CULTURE ET DIFFÉRENCIATION EN MYOTUBES DES CELLULES PROGÉNITRICES MYOGÉNIQUES .....	44
2.8	FABRICATION D'HYDROGELS EN POLYACRYLAMIDE PERMETTANT DE MODULER LA RIGIDITÉ DU SUBSTRAT DES CELLULES EN CULTURE .....	45
2.8.1	<i>Étape préparatoire: Conception des lamelles réactives et siliconées.....</i>	45
2.8.2	<i>Étape de réalisation: polymérisation de mélanges de polyacrylamides entre les deux lamelles.....</i>	45
2.8.3	<i>Couplage de protéines de revêtement aux hydrogels.....</i>	47
2.9	MICROSCOPIE À FORCE ATOMIQUE (AFM).....	48
2.9.1	<i>Mesure en AFM sur des coupes sagittale de muscles frais.....</i>	51
2.9.2	<i>Mesures en AFM sur des fibres musculaires individualisées.....</i>	51
2.10	STATISTIQUES .....	51
<b>3</b>	<b>RÉSULTATS.....</b>	<b>53</b>
3.1	L'ACTIVITÉ MYOGÉNIQUE DES CPM EST ALTÉRÉE EN FONCTION DE L'ÂGE.....	53
3.2	POTENTIELS DE PROLIFÉRATION ET DE DIFFÉRENCIATION DES CPM EN FONCTION DE L'ÂGE ..	55
3.3	L'AUGMENTATION DE LA RIGIDITÉ DU MUSCLE SQUELETTIQUE EST LIÉE AU VIEILLISSEMENT CHEZ LES SOURIS. ....	57
3.4	LES FIBRES ENDOMMAGÉES DE MUSCLES ÂGÉS ONT UNE GRANDE RIGIDITÉ .....	60
3.5	RÉCAPITULATION <i>IN VITRO</i> DE L'INFLUENCE DE LA RIGIDITÉ SUR L'ACTIVITÉ DES CPM.....	61
3.5.1	<i>La rigidité influence le comportement des CPM cultivées.....</i>	61
3.5.2	<i>Vérification de l'uniformité du revêtement de collagène et de l'adhérence des CPM en fonction de la rigidité des substrats.....</i>	63
<b>4</b>	<b>DISCUSSION .....</b>	<b>65</b>
4.1	ACTIVITÉ MYOGÉNIQUE DES CPM. ....	65
4.1.1	<i>Potentiel de prolifération et de différenciation des CPM.....</i>	68
4.2	LE COLLAGÈNE ET LES <i>ADVANCED GLYCATION END-PRODUCTS</i> (AGE) AUGMENTENT DANS LE MUSCLE DES SOURIS ÂGÉES. ....	70
4.3	LA RIGIDITÉ AUGMENTE DANS LE MUSCLE SQUELETTIQUE ET LES FIBRES DE MUSCLES ÂGÉS .....	72

4.4	IMPACT DE LA RIGIDITÉ SUR LA PROLIFÉRATION ET LA DIFFÉRENCIATION .....	74
4.5	RÉCAPITULATION <i>IN VITRO</i> DE L'INFLUENCE DE LA RIGIDITÉ SUR L'ACTIVITÉ MYOGÉNIQUE DES CPM	76
<b>5</b>	<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>78</b>
	<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>80</b>
	<b>LISTE DES RÉFÉRENCES.....</b>	<b>81</b>
	<b>ANNEXES .....</b>	<b>91</b>

### 3 LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1.1 Organisation du muscle squelettique .....	14
Figure 1.2 Caractéristiques des cellules souches mésenchymateuses .....	18
Figure 1.3 Structure interne d'une fibre musculaire .....	20
Figure 1.4 La fibre musculaire et la cellule satellite .....	20
Figure 1.5 Facteurs de transcription intervenant dans les différentes étapes de la différenciation myogénique adulte .....	22
Figure 1.6 Modèles de division asymétrique et symétrique des cellules satellites .....	23
Figure 1.7 La régulation de la masse musculaire est sous contrôle de la voie de signalisation IGF1-AKT .....	29
Figure 1.8 Principales voies de signalisation de la mécanotransduction .....	31
Figure 2.1 Schéma d'élaboration d'hydrogels en polyacrylamide possédant des rigidités variables .....	47
Figure 2.2 Schéma du montage de l'AFM .....	48
Figure 2.3 Illustration des types de courbes F/D obtenues en fonction du type d'échantillon .....	50
Figure 3.1 L'activité myogénique est diminuée chez les CPM des fibres âgées. ....	54
Figure 3.2 Les potentiels intrinsèques de prolifération et de différenciation des CPM ne sont pas altérés avec l'âge. ....	56
Figure 3.3 La rigidité du muscle squelettique est augmentée avec l'âge. ....	59
Figure 3.4 Une rigidité plus élevée des fibres endommagées issues de souris âgées altère l'activité des CPM. ....	61
Figure 3.5 Le comportement des CPM a été reproduit en culture sur des matrices ayant des rigidités similaires aux fibres. ....	62
Figure 3.6 La rigidité des hydrogels n'a pas influencé l'adhérence des CPM. ....	64



## 4 LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 Localisation des constituants de la MEC.....	16
Tableau 2.1 Anticorps primaires utilisés en immunofluorescence.....	41
Tableau 2.2 Anticorps secondaires utilisés en immunofluorescence .....	42
Tableau 2.3 Proportion des constituants utilisée permettant de produire des hydrogels de différentes rigidités.....	46
Tableau 2.4 Proportion des constituants pour former les hydrogels de différentes rigidités. .....	46

## **5 LISTE DES ANNEXES**

Annexe 1 Autorisations pour les emprunts de figures .....	91
---	----

## 6 LISTE DES ABRÉVIATIONS

AFM	<i>Atomic force microscopy</i>
AGE	<i>Advance glycation end-product</i>
BM-MSC	<i>Bone marrow stem cells</i>
CFU-F	<i>Colony forming unit fibroblasts</i>
CML	<i>Carboxymethyllysine</i>
CPD	<i>Doublement de population cumulatif</i>
CPM	<i>Cellules progénitrices myogéniques</i>
COL	<i>Motif protéique d'homologie au collagène (Gly-X-Y)</i>
CSA	<i>Cross sectional area</i>
DGC	<i>Complexe dystrophine/glycoprotéine</i>
EDL	<i>Extensor digitorum longus</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated receptor kinase (MAPK)</i>
FA	<i>Focal adhesion</i>
FAK	<i>Focal adhesion kinase</i>
FC	<i>Focal complex</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
GH	<i>Growth hormone</i>
GM	<i>Growth medium</i>
GSK3 $\beta$	<i>Glycogen synthase kinase 3<math>\beta</math></i>
HP-1	<i>Heterochromatin protein-1</i>
HS	<i>Sérum de cheval</i>
HSPG	<i>Heparan sulfate proteoglycan</i>
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule-1</i>
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
IGFBP	<i>Insulin-like growth factor binding proteins</i>
IGF-1R	<i>Insulin-like growth factor-1 receptor</i>
ILK	<i>Integrin-linked kinase</i>

ISCT	Société internationale pour la thérapie cellulaire
JNK	c-Jun N-terminal Kinase (sentier des MAPK)
LB	Lame basale
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MB	Membrane basale
MEC	Matrice extracellulaire
MEF	<i>Mouse embryonic fibroblast</i>
MEK	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i> (MAPK)
MGF	<i>Mechano growth factor</i> (variant d'IGF-1)
MHC	<i>Myosin heavy chain</i>
MMP	Métalloprotéinase matricielle
MRF	<i>Myogenic related factor</i>
mrSC	Cellules stromales résidentes du muscle
MSC	Cellules souches mésenchymateuses
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
MWW	test Mann-Whitney-Wilcoxon
NC	Motif protéique d'homologie non-collagénique
NCAM	<i>Neural cell adhesion molecule</i>
NICD	<i>Notch intracellular domain</i>
NOX	NADPH oxydase
PA	Polyacrylamide
PD	Doublement de population
PECAM-1	<i>Platelet endothelial cell adhesion molecule-1</i>
PEG	Polyéthylène glycol
Pen	Pentosidine
PFA	Paraformaldehyde
PI3K	<i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3 kinase</i>
PKB/Akt	Protéine kinase B aussi connue sous le nom de Akt
p16 <sup>INK4a</sup>	Protein p16, <i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>
p38	Protein p38 (MAPK)
QPCR	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i>

Quad	Quadriceps
RGD	Séquence arginine-glycine-acide aspartique
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
SANPAH	N-succinimidyl-6-[4-azido-2-nitrophenylamino] hexanoate
Sfrp	<i>Secreted frizzled-related protein</i>
TA	Tibialis anterior
TP	Température pièce
Wif	<i>Wnt inhibitory factor</i>
Wnt	<i>Wingless-related integration site</i>

# 1 INTRODUCTION

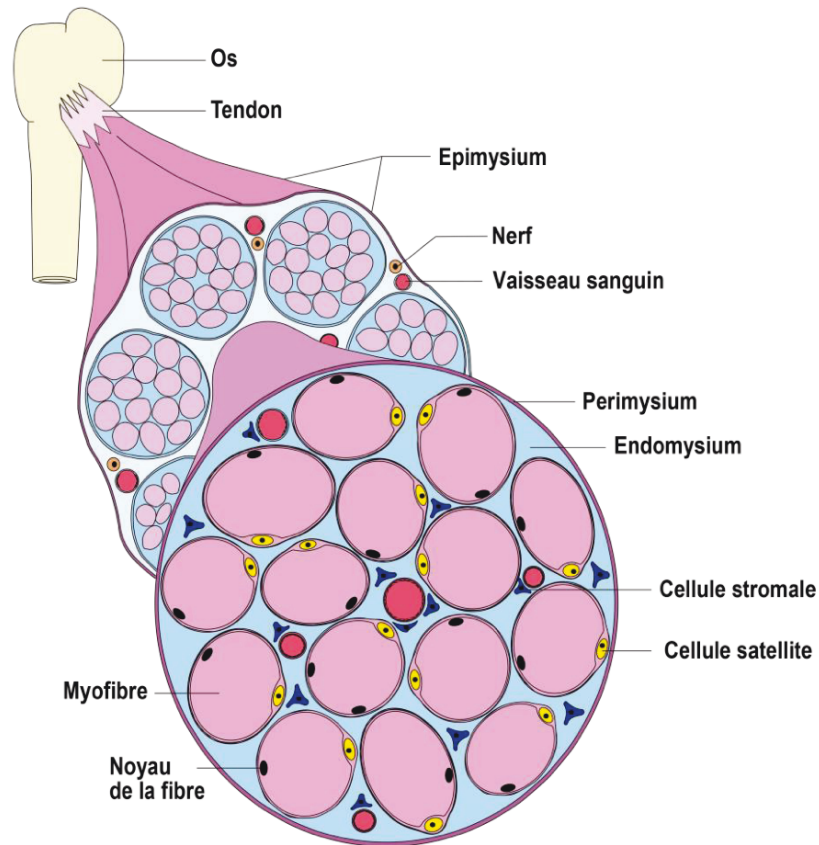
## 1.1 Le muscle squelettique

Le muscle squelettique est le tissu qui se retrouve en plus grande proportion chez l'Homme (HUARD, LI et al. 2002). Sa fonction principale consiste à permettre le mouvement du squelette. Il possède plusieurs propriétés mécaniques (rigidité, extensibilité, élasticité) qui lui permettent de résister aux déformations sans subir de dommages puis de reprendre sa forme originale. Le muscle squelettique a un rôle métabolique important du fait de l'énorme quantité de substrat qu'il consomme.

### 1.1.1 Structure et fonctions

Le muscle est constitué d'une portion myogénique et d'une portion stromale. La portion myogénique (majoritaire) est constituée de fibres musculaires, unités contractiles du muscle, et des cellules satellites situées en périphérie de ces dernières. La partie stromale est quant à elle faite de plusieurs couches de tissus conjonctifs et de divers types cellulaires.

La première couche de tissu conjonctif qui enveloppe le muscle en entier est nommée fascia ou épimysium. Le muscle se subdivise ensuite en multiples faisceaux (ou groupe de fibres), enveloppés par d'autres couches de tissu conjonctif que l'on nomme le pérимыsium. Finalement, chaque fibre musculaire est enveloppée par un endomysium (GILLIES ET LIEBER 2011).



**Figure 1.1 Organisation du muscle squelettique**

Le muscle squelettique est subdivisé en une portion stromale (bleue) et une portion myogénique (rose). La portion stromale du muscle est subdivisée en trois parties: l'endomysium, le périmysium et l'épimysium. Le tissu conjonctif entourant les fibres musculaires contient un réseau de capillaires et de nerfs nécessaires pour l'apport en nutriments et l'innervation du tissu, respectivement. De nombreux types cellulaires tels que les cellules stromales sont retrouvés à proximité des vaisseaux sanguins (Frédéric Trenz, *Influence de l'environnement biochimique et biomécanique sur les cellules souches du muscle squelettique*, thèse de doctorat, 2013, FMSS, Université de Sherbrooke).

Ces couches de tissus conjonctifs sont constituées en un assemblage complexe de protéines et de protéoglycanes dans lequel s'insère les vaisseaux sanguins ainsi que l'innervation, nécessaire au bon fonctionnement du muscle (**Figure 1.1**). Ce réseau complexe aux constituants variés est appelé la matrice extracellulaire (MEC). Plusieurs types cellulaires sont présents dans le tissu conjonctif telles les cellules stromales multipotentes (mrSC), fibroblastiques, nerveuses et d'origine hématopoïétique (e.g. macrophages).

### 1.1.2 La portion stromale

Le stroma supporte le réseau nerveux et vasculaire. Il assure à la fois l'élasticité du muscle et participe à la transmission des forces induites par la contraction, aux tendons et aux os (KJAER 2004). Cette dernière fonction est possible grâce aux interactions de la MEC avec les fibres musculaires, principalement à l'aide de deux complexes: les intégrines et le complexe dystrophine/glycoprotéine (DGC) (RAMASWAMY, PALMER et al. 2011).

#### 1.1.2.1 La matrice extracellulaire

Plusieurs types cellulaires, dont les fibres musculaires, sont recouverts d'une couche de MEC aussi appelée lame basale (LB). Cette couche spécialisée est en contact direct avec la membrane plasmique de la fibre musculaire. Elle est majoritairement composée de collagène, de protéoglycanes et de glycoprotéines. L'assemblage en polymères homotypiques ou hétérotypiques de ces divers constituants rendent possible les interactions cellule-MEC grâce à des domaines protéiques d'homologie collagénique (COL) ou non-collagénique (NC) (AUMAILLEY ET GAYRAUD 1998).

Les collagènes retrouvés dans le muscle sont les collagènes fibrillaires (e.g. type I, III, V, IX et XI) et les non fibrillaires (e.g. type IV et VI). Ils sont agencés en réseaux et forment une sorte d'armature constituée de plusieurs types de protéoglycanes (e.g. perlécane, le biglycane, l'agrine et la décorine). Ces derniers ont une structure fortement hydrophile et sont reconnus pour réguler la distribution et l'activation de plusieurs facteurs de croissance (GALLAGHER 2001; HYNES 2009). Chacun de ces constituants se distribue de façon préférentielle dans un feuillet de la MEC (**Tableau 1.1**). Il en va de même pour les glycoprotéines NC telles la vitronectine, la fibronectine, les ténascines, les laminines et l'entactine (SANES 2003; GROUNDS, SOROKIN et al. 2005).



**Tableau 1.1 Localisation des constituants de la MEC**

<b>Espace interstitiel</b>	<b>Lame basale (LB)</b>
<b>Collagènes</b> (types I, III, VI)	<b>Laminines</b>
<b>Fibronectine</b>	<b>Entactine/nidogene-1</b>
<b>Vitronectine</b>	<b>Collagène</b> (type IV)
<b>Ténascines</b> (4 formes)	Protéoglycanes: <b>perlécane, agrine</b>
Protéoglycanes: <b>décorine, biglycane</b>	

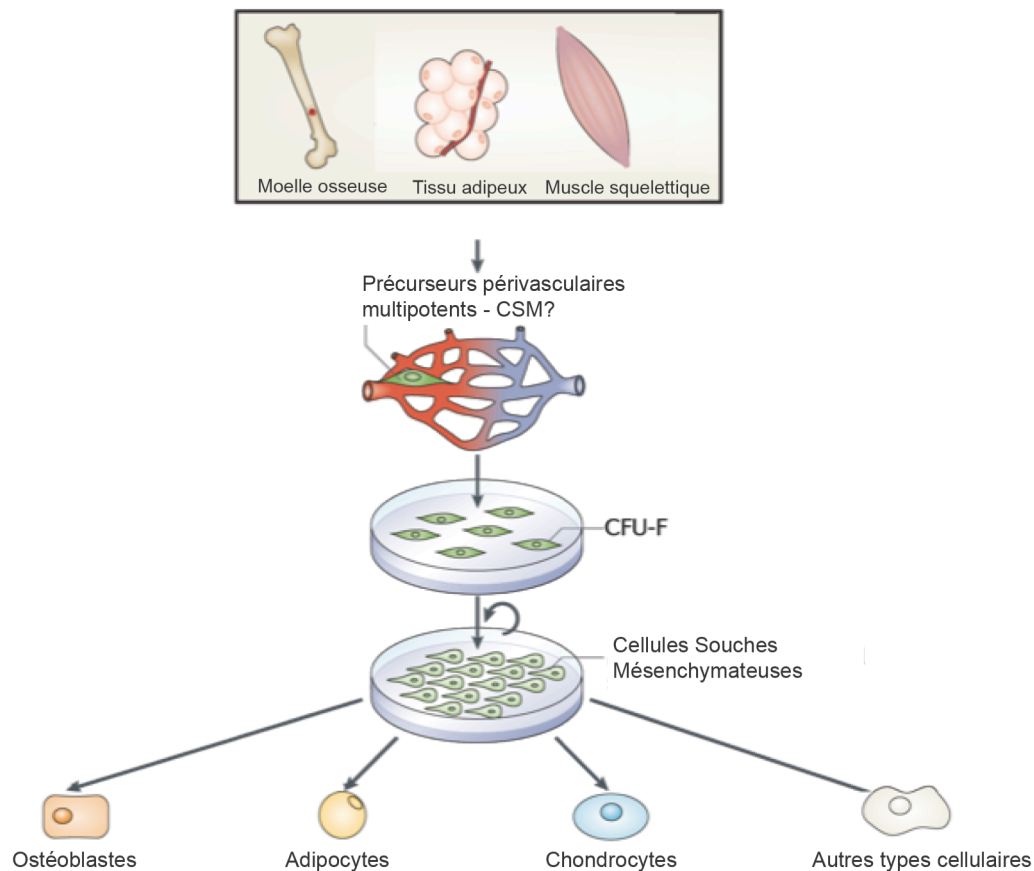
\*(GROUNDS, SOROKIN et al. 2005)

La MEC a plusieurs fonctions biologiques. Elle permet de maintenir l'intégrité du tissu (MICHELE ET CAMPBELL 2003), la différenciation cellulaire (HAUSCHKA ET KONIGSBERG 1966) ainsi que de participer à la régénération du muscle (KAARIAINEN, JARVINEN et al. 2000). Outre les fibres musculaires capable de produire les composantes de la lame basale avec lesquelles elles sont en contact, les fibroblastes et les myofibroblastes font partie de ces autres types cellulaires et sont aussi connus pour être impliqués dans la formation et le développement de la MEC (VOERMANS, BONNEMANN et al. 2008; TRENSZ, HAROUN et al. 2010; BAUM ET DUFFY 2011). Les fibroblastes répondent autant à des stimuli mécaniques (FLUCK, TUNC-CIVELEK et al. 2000) que chimiques en produisant des facteurs paracrins pour interagir avec les cellules avoisinantes et les différentes composantes de la MEC. Des cellules stromales progénitrices se trouvent également dans le stroma du muscle squelettique (TRENSZ, HAROUN et al. 2010). Il a d'ailleurs été montré chez des cellules similaires, isolées de moelle osseuse (BM-MSc), que la prolifération, la migration et la différenciation pouvaient être modulées par la rigidité de l'environnement (DISCHER, MOONEY et al. 2009; HOLLE, TANG et al. 2013). Ainsi, la MEC est une composante dynamique du muscle squelettique ayant la possibilité de transmettre les stress mécaniques, tout en emmagasinant et libérant des facteurs de croissance permettant au tissu de s'adapter de façon continue aux besoins physiologiques.

### **1.1.2.2 Les cellules stromales résidentes du muscle (mrSC)**

Les cellules souches mésenchymateuses (MSC) ont été isolées pour la première fois par l'équipe de Friedenstein *et al.* (FRIEDENSTEIN, CHAILAKHYAN et al. 1974). Elles se caractérisent par une capacité d'adhérer au plastique, une morphologie fusiforme, une capacité à former des colonies. Plus encore, elles sont qualifiées de multipotentes

puisqu'elles peuvent se différencier en adipocytes, chondrocytes et ostéoblastes autant *in vitro* qu'*in vivo*. Il a plus tard été montré que les MSC étaient ubiquitaires puisqu'elles se retrouvaient dans plusieurs tissus dont le tissu adipeux (ZUK, ZHU et al. 2001; SCIME, GRENIER et al. 2005; MORISSETTE MARTIN, MAUX et al. 2015), le muscle squelettique (ASAKURA ET RUDNICKI 2002; GRENIER, SCIME et al. 2007; JOE, YI et al. 2010; LEBLANC, TRENSZ et al. 2011), les glandes salivaires (FENG, VAN DER ZWAAG et al. 2009), les glandes parathyroïdes (SHIH, KUO et al. 2009), le liquide synovial (FAN, VARSHNEY et al. 2009), le cordon ombilical (LU, LIU et al. 2006), ainsi que la pulpe dentaire (GRONTHOS, MANKANI et al. 2000). De par leur caractéristiques et les facteurs qu'elles relarguent, les MSC sont clairement d'un grand intérêt pour la médecine régénératrice (**Figure 1.2**).



**Figure 1.2 Caractéristiques des cellules souches mésenchymateuses**

La fraction cellulaire adhérente de plusieurs tissus contient des cellules progénitrices stromales qui peuvent donner naissance à des colonies ayant une morphologie fibroblastique. Cette sous-population cellulaire hétérogène est localisée à la périphérie des vaisseaux sanguins (périvasculaire). Cultivées dans les conditions appropriées, elles peuvent être amplifiées *in vitro* sur plusieurs passages et, avec l'aide de stimuli appropriés, expriment leur multipotente, i.e. capable de se différencier dans les lignées ostéogéniques, adipogéniques ou chondrogéniques. Leur différenciation en d'autres types de cellules matures non mésenchymateuses reste un sujet de débat. (Mesenchymal stem cells, MSC; Colony forming unit fibroblasts, CFU-F) (Adaptée de Downey et al. non publié).

Afin de standardiser les différentes appellations et caractérisations des MSC, l'*International Society for Cellular Therapy* (ISCT) a établi les critères minimaux pour identifier les MSC soit: (1) la capacité à adhérer au plastique en condition de culture standard, (2) l'expression des antigènes de surface CD105, CD90, CD73 et l'absence d'expression des antigènes CD34, CD45, CD14 ou CD11b, CD79 $\alpha$  ou CD19 puis HLA classe II et finalement (3) leur potentiel de différenciation en ostéoblastes, en adipocytes et en chondrocytes (DOMINICI, LE BLANC et al. 2006; BOURIN, BUNNELL et al. 2013).

Ces critères ont été définis pour standardiser les MSC d'origine humaine et il est important de souligner qu'il n'y a pas de critères uniformes pour les modèles humains et animaux, notamment en ce qui a trait aux marqueurs de surface. Chez la souris par exemple, les antigènes utilisés pour isoler les MSC dans divers tissus sont: l'expression de Sca-1 (Stem cell antigen-1) en plus, comme pour les MSC humaines, de l'absence des antigènes de surface hématopoïétiques.

Un des rôles attribués aux MSC est le maintien de la niche des cellules souches qui sont, elles mêmes, primordiales à la réparation/régénération du parenchyme du tissu (WILLIAMS ET HARE 2011). Les cellules souches participent donc à l'homéostasie des organes, à la cicatrisation des plaies et au vieillissement normal des tissus (WILLIAMS ET HARE 2011). Les MSC résidentes du muscle squelettique (*muscle resident stromal cells*, mrSC) jouent aussi un rôle dans la réparation du muscle et l'accentuation des conséquences des pathologies musculaires. En effet, plusieurs équipes dont la nôtre ont montré leur contribution au niveau de la formation de la fibrose et de l'infiltration de tissu adipeux dans un modèle de souris dystrophiques (JOE, YI et al. 2010; TRENSZ, HAROUN et al. 2010) et de l'ossification hétérotopique (LEBLANC, TRENSZ et al. 2011; DOWNEY, LAUZIER et al. 2015).

### **1.1.3 La portion myogénique**

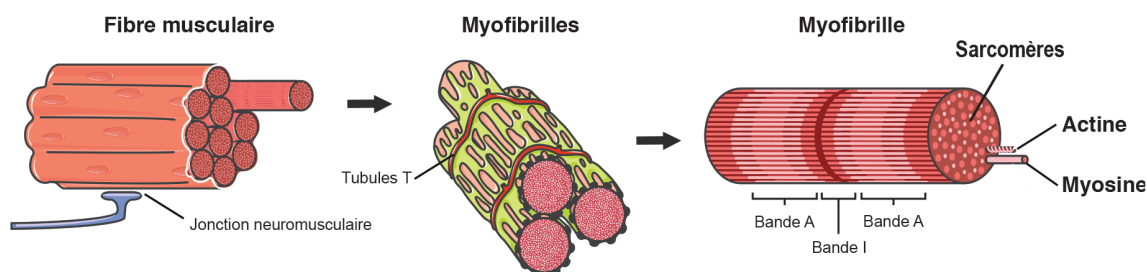
La portion myogénique représente le parenchyme du muscle. Elle est constituée de fibres musculaires, unité contractile du muscle, et de cellules satellites, responsables de la régénération et du maintien des fibres.

#### **1.1.3.1 Les fibres musculaires**

La fibre musculaire, ou myofibre, est un syncytium issu de la fusion de centaines de cellules progénitrices myogéniques (CPM), ou myoblastes. Chez l'Homme, elles ont un diamètre de 10 à 100  $\mu\text{m}$  et peuvent mesurer jusqu'à 30 cm de longueur (KONNO ET SUZUKI 2000). Il s'agit de l'unité fonctionnelle du muscle. Sa membrane, que l'on nomme sarcolemme, est excitable et est reliée au système nerveux par une jonction neuromusculaire à sa surface. Elle possède des tubules transverses (tubule T) sur toute sa longueur et de façon régulière, ce qui assure la conduction des signaux transmis au niveau

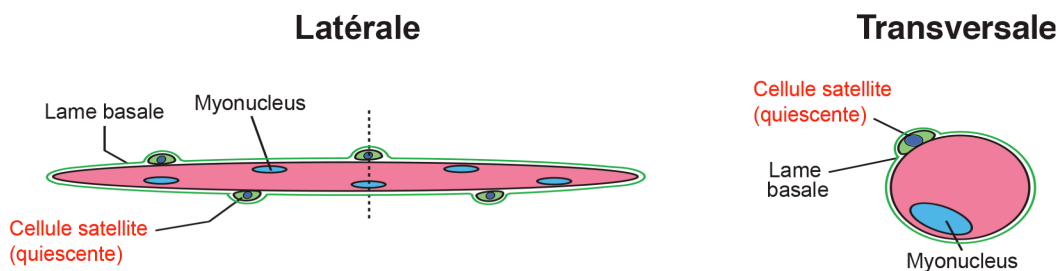
de la jonction neuromusculaire. Les multiples noyaux se situent en périphérie de la fibre, i.e. près du sarcolemme.

Son cytosquelette est principalement constitué de myofibrilles qui sont en fait un assemblage de filaments épais de myosine et fins d'actine. Ces chaînes d'unités contractiles sont disposées de façon répétitive, et chaque unité est appelée sarcomère. C'est l'ensemble de ces divers niveaux de structures qui permettent la contraction et qui donnent au muscle squelettique son apparence striée (**Figure 1.3**).



**Figure 1.3 Structure interne d'une fibre musculaire**

La fibre musculaire est constituée de myofibrilles qui contiennent les filaments d'actine et de myosine. Son organisation en bandes A et I donne au muscle squelettique son allure striée au microscope. (Adaptée de Frédéric Trenz, *Influence de l'environnement biochimique et biomécanique sur les cellules souches du muscle squelettique*, thèse de doctorat, 2013, FMSS, Université de Sherbrooke).



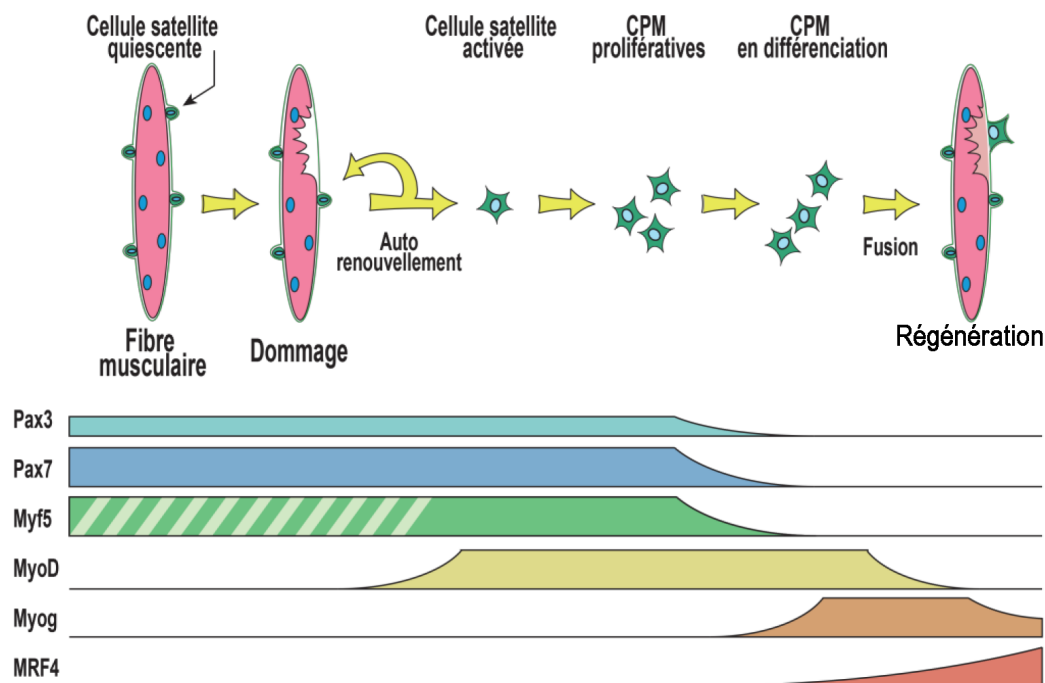
**Figure 1.4 La fibre musculaire et la cellule satellite**

La fibre musculaire est une cellule multinucléée issue de la fusion de cellules progénitrices myogéniques (CPM). La cellule satellite est séquestrée entre la membrane plasmique de la fibre et la lame basale qui l'enveloppe. Normalement quiescentes, elles sont capables de s'activer et de régénérer les fibres à la suite d'un dommage (Adaptée de Frédéric Trenz, *Influence de l'environnement biochimique et biomécanique sur les cellules souches du muscle squelettique*, thèse de doctorat, 2013, FMSS, Université de Sherbrooke).

### 1.1.3.2 Les cellules satellites

Les cellules satellites ont été découvertes en 1961 et sont responsables de la régénération de la portion myogénique du muscle squelettique (MAURO 1961; TEDESCO, DELLAVALLE et al. 2010). Elles sont localisées en périphérie de la fibre, entre le sarcolemme et la lame basale, et normalement dans un état quiescent (**Figure 1.4**). Toutefois, suite à un dommage, elles s'activent et prolifèrent et sont appelées alors cellules progénitrices myogéniques (CPM). Par la suite, elles se différencient en fusionnant avec des fibres endommagées ou simplement entre elles pour créer de nouvelles fibres musculaires (YIN, PRICE et al. 2013). Plusieurs marqueurs de surface ont été identifiés et, sont utilisés seuls ou en combinaison, pour permettre de les localiser. Il s'agit principalement de la M-cadhérine, l'antigène CD34 et la sous-unité  $\alpha 7$  des intégrines (IRINTCHEV, ZESCHNIGK et al. 1994; BEAUCHAMP, HESLOP et al. 2000; CORNELISON, FILLA et al. 2001; DAY, SHEFER et al. 2007; GNOCCHI, WHITE et al. 2009).

Il y a aussi les facteurs de transcription myogéniques qui permettent d'identifier avec une très grande spécificité les CPM. Il s'agit de Pax7 (Paired-box 7) exprimé pour plusieurs espèces exclusivement dans les cellules satellites (SEALE, SABOURIN et al. 2000; MORRISON, LOOF et al. 2006) et des facteurs de la famille des *Myogenic related factors* (MRF), MyoD, Myf5, myogénine et MRF4 (**Figure 1.5**). Ces facteurs étant exprimés à divers moments de la différenciation, leur immunomarquage constitue une approche très efficace pour caractériser l'état de différenciation des cellules satellites et des CPM.

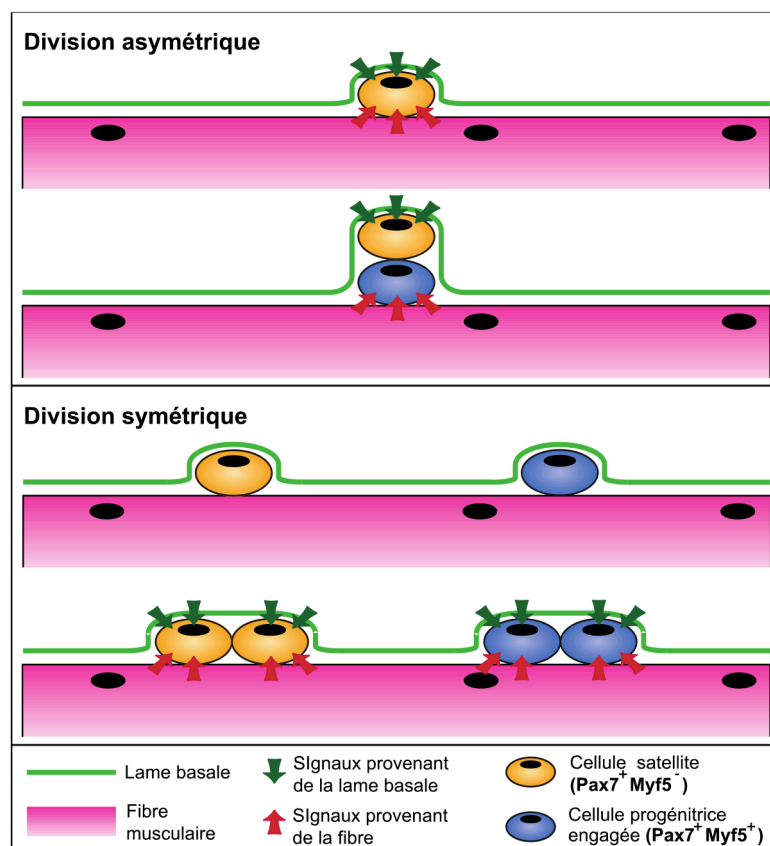


**Figure 1.5 Facteurs de transcription intervenant dans les différentes étapes de la différenciation myogénique adulte**

Le dommage des fibres musculaires induit l'activation, la prolifération et la différenciation des cellules satellites afin de réparer les fibres endommagées ou d'en former de nouvelles. Ces étapes sont orchestrées par les facteurs de transcription myogéniques. Les facteurs Pax7 et Myf5 sont exprimés par les cellules satellites quiescentes, activées et prolifératives. Toutefois les cellules satellites responsables de l'auto-renouvellement n'expriment pas Myf5 (zone hachurée). MyoD est exprimée par les CPM activées et prolifératives et plus fortement en début de différenciation. Myog et Mrf4 sont quant à elles exprimées lors de la maturation et la fusion des CPM. Tous ces facteurs de transcription peuvent être utilisés comme marqueurs décrivant l'état de différenciation des CPM. (Adaptée de Frédéric Trenz, *Influence de l'environnement biochimique et biomécanique sur les cellules souches du muscle squelettique*, thèse de doctorat, 2013, FMSS, Université de Sherbrooke).

Les chercheurs s'entendent aujourd'hui pour dire que les cellules satellites constituent une population cellulaire hétérogène (BIRESSI ET RANDO 2010). Ainsi, il a été montré que leurs capacités de prolifération, de différenciation et d'auto-renouvellement varient et que les cellules satellites se multiplient par un mécanisme appelé division asymétrique. Ce processus permet leur auto-renouvellement et donc leur pérennité. Une cellule mère ( $Pax7^+Myf5^-$ ) génère par ce mécanisme une cellule fille ( $Pax7^+Myf5^+$ ) qui

s'engage dans la prolifération et la différenciation myogénique et, une autre cellule fille ( $\text{Pax7}^+\text{Myf5}^-$ ), qui assure son auto-renouvellement (**Figure 1.6**).



**Figure 1.6 Modèles de division asymétrique et symétrique des cellules satellites**

La division asymétrique (orientation baso-apicale) des cellules satellites permet de maintenir le réservoir de cellules satellites ( $\text{Pax7}^+\text{Myf5}^-$ ) alors que la division symétrique (orientation planaire) conduit à deux cellules filles identiques ( $\text{Pax7}^+\text{Myf5}^+$ ) (Adaptée de Frédéric Trenz, *Influence de l'environnement biochimique et biomécanique sur les cellules souches du muscle squelettique*, thèse de doctorat, 2013, FMSS, Université de Sherbrooke).

Deux approches ont permis leur isolement et leur étude. La méthode dite classique, ou par dissociation enzymatique, consiste à libérer la cellule satellite de sa niche anatomique. Pour ce faire, le muscle est d'abord émincé et ensuite digéré par un mélange d'enzymes (e.g. mélange collagénase et dispase) qui permet la dégradation de la MEC et de la lame basale. Pour enrichir les CPM obtenues par dissociation enzymatique, il y a la technique misant sur l'adhérence préférentielle (ou « differential plating ») des CPM au collagène. À la suite de courtes expositions de la préparation de cellules en suspension, la population de CPM s'enrichira jusqu'à devenir virtuellement pure. Enfin, il est possible



d'utiliser la cytométrie en flux où cette fois les cellules sont triées selon l'immunomarquage de marqueurs spécifiques ou encore directement par la fluorescence des cellules issues de souris transgénique (eg. Pax7-eGFP) (DANOVIZ ET YABLONKA-REUVENI 2012). Cette méthode d'isolement n'est pas seulement responsable de l'élaboration de conditions optimales de culture ou du développement de diverses sources animales, mais a permis de comprendre les mécanismes d'étalement, de prolifération et de différenciation (BURTON, VIERCK et al. 2000).

La seconde méthode consiste à isoler des fibres individuelles sur lesquelles les cellules satellites sont préservées dans leur niche, i.e. entre le sarcolemme et la lame basale. Cela est rendu possible par le biais de l'utilisation de la collagénase seule qui ne digère pas la membrane basale. Cette méthode présente l'avantage de pouvoir étudier les cellules satellites directement dans leur niche anatomique ce qui a une grande valeur biologique. D'ailleurs, c'est en utilisant des gènes rapporteurs (Pax7, Myf5,  $\beta$ -Gal), que Collins et al. (COLLINS, OLSEN et al. 2005) ont montré que la transplantation d'une seule fibre et de ses cellules satellites (2-7 cellules/fibre) dans un muscle endommagé, pouvait contribuer à la réparation de plusieurs centaines de fibres *in situ*. Cette expérience a démontré toute la puissance du maintien des cellules dans leur environnement puisque qu'il n'est pas possible d'obtenir de tels résultats même en transplantant des millions de myoblastes préalablement cultivés (MONTARRAS, MORGAN et al. 2005; SACCO, DOYONNAS et al. 2008).

Les fibres individualisées offre également la possibilité d'étudier les CPM une fois qu'elles ont migré de la fibre au substrat de culture (SHEFER ET YABLONKA-REUVENI 2005). Cette méthode permet ainsi l'étude des gènes impliqués durant leur activation. (PASUT, JONES et al. 2013).

C'est pour cela que les études effectuées avec les fibres sont d'un grand intérêt pour la médecine régénératrice et le traitement de toutes les pathologies musculaires (BEAUCHAMP, MORGAN et al. 1999; MONTARRAS, MORGAN et al. 2005; COSSU ET SAMPAOLESI 2007).

## 1.2 Le vieillissement du muscle

Le déclin progressif et physiologique des fonctions de l'ensemble des tissus est un processus que l'on nomme le vieillissement. Au niveau du muscle squelettique, il se caractérise par la perte progressive de masse et de force musculaire, que l'on nomme

sarcopénie (DI IORIO, ABATE et al. 2006; JANG, SINHA et al. 2011; LI ET IZPISUA BELMONTE 2014). Cette perte de masse est explicable par un déclin croissant de la taille et du nombre de fibres musculaires qui s'accélérait chez l'Homme vers 50 ans (FAULKNER, LARKIN et al. 2007). En effet, la perte de force musculaire est directement proportionnelle à la réduction de l'aire transversale de la fibre (CSA) (FRONTERA, HUGHES et al. 2000). Cette perte de masse musculaire a des conséquences importantes sur l'autonomie des personnes vieillissantes (FAULKNER, LARKIN et al. 2007). Du fait qu'elles ont une capacité musculaire réduite, les personnes âgées sont plus susceptibles aux chutes qui, combiné à une fragilité osseuse, rendent cette population très vulnérable. Des statistiques à cet égard montrent un taux de mortalité très élevé dans les 6 mois suivant les fractures de la hanche (CASTRONUOVO, PEZZOTTI et al. 2011).

Une autre caractéristique du muscle vieillissant est la diminution de son potentiel régénératif, facteur contribuant également à la sarcopénie (COLLADO, BLASCO et al. 2007; ARTHUR ET COOLEY 2012). Certains expliquent ce déclin par une diminution du nombre de cellules satellites avec l'âge, tandis que d'autres observent plutôt une augmentation (RENAULT, THORNELL et al. 2002; CONBOY, CONBOY et al. 2003; SAJKO, KUBINOVA et al. 2004; BRACK, BILDSE et al. 2005; SHEFER, VAN DE MARK et al. 2006; BROOKS, SCHUENKE et al. 2009; SCIME, DESROSIERS et al. 2010). La variabilité de ces observations est due aux différences de modèles animaux, de types de muscles, de l'âge des spécimens étudiés et des méthodes pour dénombrer les cellules.

Le déclin du potentiel régénératif lié à la sarcopénie lors du vieillissement pourrait être causé par une altération des fonctions des cellules satellites. En effet, il a été postulé que ces changements liés à l'âge proviendraient à la fois d'altérations intrinsèques et du milieu environnant des cellules satellites (CONBOY, CONBOY et al. 2005; BRACK, CONBOY et al. 2007; JANG, SINHA et al. 2011). À vrai dire, l'ensemble des écrits supportent l'hypothèse de modifications dans l'environnement des cellules satellites.

En somme, les causes menant à la sarcopénie semblent être multifactorielles et les mécanismes cellulaires toujours méconnus.

### 1.2.1 Principales voies de signalisation

La littérature montre qu'au moins trois voies de signalisation sont modulées lors du vieillissement, ce qui a pour conséquence d'altérer le microenvironnement des cellules satellites. Ces voies sont NOTCH, WNT et l'IGF-1.

La voie NOTCH est régulée par une grande diversité de facteurs (activité du ligand, activateur et répresseur de la transcription), et il reste encore beaucoup à découvrir à son sujet (BRAY 2006). La signalisation NOTCH est importante pour la régénération du muscle chez l'adulte (CONBOY, CONBOY et al. 2003; CONBOY, CONBOY et al. 2005; CARLSON, HSU et al. 2008). Dans le contexte du muscle squelettique, le ligand Delta se lie au récepteur Notch et le domaine intracellulaire de NOTCH (NICD) migre au noyau pour augmenter l'expression de facteurs de transcription (HES1, HEY1) ce qui poussera les cellules satellites à proliférer (ARTHUR ET COOLEY 2012).

Lors du vieillissement, il y a une diminution du nombre de ligand DELTA1 et de récepteurs NOTCH1 dans les CPM de muscles âgés (CONBOY, CONBOY et al. 2003; CARLSON, HSU et al. 2008). Cette diminution de la signalisation NOTCH contribue au déclin de la capacité de régénération dans le muscle âgé (CONBOY, CONBOY et al. 2005; CARLSON, HSU et al. 2008). Par une expérience de parabiose hétérochronique avec des souris jeunes et âgées, l'équipe de Rando a montré que l'expression du ligand DELTA et l'activité de NOTCH pouvaient être augmentées dans le muscle de souris âgée grâce à l'apport exogène de la souris jeune (CONBOY, CONBOY et al. 2005). La diminution de la signalisation NOTCH liée au vieillissement s'expliquerait par des facteurs en amont, comme par exemple une diminution d'activité de la voie MAPK/ERK, ou à une réduction des niveaux de testostérone (CARLSON, SUETTA et al. 2009; KOVACHEVA, HIKIM et al. 2010). De plus, les taux élevés de TGF- $\beta$  auraient également une incidence sur la perte de signalisation (ARTHUR ET COOLEY 2012). Il a aussi été montré que l'activation de la voie NOTCH bloque l'expression des inhibiteurs de kinase Cycline-dépendante (p15, p16, p21 et p27) provoqué par la voie TGF- $\beta$ /pSMAD3. L'expression de ces régulateurs négatifs du cycle cellulaire est aussi induite par l'inhibition de la voie NOTCH. Cela suggère qu'une perturbation de l'équilibre entre les voies TGF- $\beta$ /pSMAD3 et NOTCH contribuerait à la diminution du potentiel de régénération du muscle vieillissant (CARLSON, HSU et al. 2008).

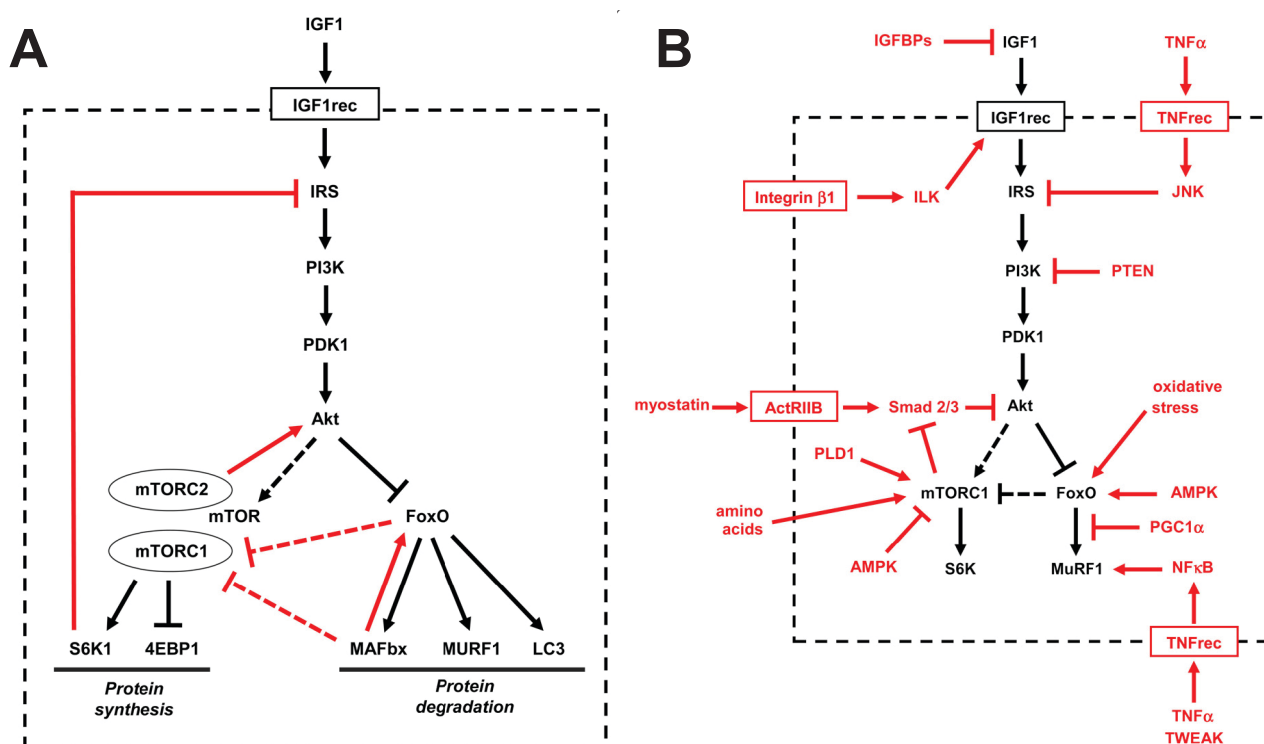
Il a été montré que la voie WNT canonique contrôle la transition entre la prolifération à la différenciation des CPM lors de la régénération (FUJIMAKI, HIDAKA et al. 2014). Plusieurs études suggèrent qu'il y aurait une exacerbation du taux sérique de WNT3a (agonistes WNT canonique) dans le muscle squelettique âgé (BRACK, CONBOY et al. 2007; ARTHUR ET COOLEY 2012). En effet, l'injection d'antagonistes WNT (DKK1 et Sfrp3) a montré que les agonistes présents dans le sérum interagissaient moins avec le récepteur FRIZZLED (BRACK, CONBOY et al. 2007). De façon intéressante, quelques années après, c'est l'équipe de Naito *et al.* qui montrait l'effet activateur du complément C1q, qui augmente dans le sérum avec l'âge, sur la voie WNT (NAITO, SUMIDA et al. 2012). Depuis, il a été montré que l'augmentation d'expression du récepteur FRIZZLED1 avec l'âge avait un effet de frein sur la capacité de différenciation des CPM (DOI, ENDO et al. 2014). Toutefois, d'autres équipes n'ont pas été en mesure d'observer de telles variations, et ce tant chez l'Homme que chez la souris (CARLSON, CONBOY et al. 2009). L'augmentation de l'activité WNT canonique avec l'âge est bien sûr plus complexe que la simple stimulation d'un récepteur avec son ligand, et c'est ce qui pourrait expliquer cette contradiction apparente. En effet, notre équipe a montré que l'expression des gènes codant pour des antagonistes de la voie WNT canonique (WIF1 et SFRP2) diminue dans le muscle âgé par rapport à un muscle jeune, ce qui a pour effet de favoriser l'activité (SCIME, DESROSIERS et al. 2010).

De plus, la signalisation WNT est associée au processus de fibrose dans divers organes (ARTHUR ET COOLEY 2012). Dans le muscle âgé, l'activité WNT canonique augmente la population des mrSC et leur production de collagène (TRENZS, HAROUN et al. 2010). De plus, l'équipe de Brack *et al.* a montré que les CPM seraient poussées à passer d'un destin myogénique à un destin fibrogénique (BRACK, CONBOY et al. 2007).

L'IGF-1 est principalement produite en réponse à une sécrétion d'hormone de croissance (GH: *Growth hormone*) par la glande pinéale. Son activité et sa disponibilité sont influencées par six protéines de liaison (IGFBP: *IGF binding proteins*) qui ont aussi d'autres fonctions biologiques (VELLOSO 2008). Dans le muscle squelettique, cette voie joue un rôle important dans le maintien de la force et de la masse musculaire, la prévention de l'apoptose et la protection contre le stress oxydatif (VELLOSO 2008; OH ET KIM 2013; PIERNO, CAMERINO et al. 2013). Lors du vieillissement il y a un déclin de la production de

GH, appelé somatopause, qui causent une diminution des taux d'IGF sériques. D'autres études ont montré que certaines cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$  et IL-6) seraient également en partie responsables de la diminution d'expression d'IGF-1 et IGFBP lors du vieillissement. Enfin, la nutrition semble être un régulateur clef des taux d'IGF-1 circulants. En effet, durant la restriction alimentaire, les baisses d'IGF sont indépendantes de la sécrétion hypophysaire de GH (MAGGIO, DE VITA et al. 2013).

Une voie très étudiée dans le contexte de régulation de la masse musculaire est l'axe IGF-1-AKT. De façon simplifiée, la liaison de l'IGF-1 à son récepteur provoquera une autophosphorylation du récepteur par son activité tyrosine kinase intrinsèque. Ce nouvel état du récepteur provoquera une cascade de signalisation menant ultimement à l'activation de la kinase AKT. AKT réprime par une phosphorylation la dégradation protéique de facteurs de transcription de la famille FOXO, ce qui a pour conséquence de stimuler la synthèse de protéines par l'intermédiaire du mammalian target of rapamycin (mTOR) et de la glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) (**Figure 1.7**). Fait particulièrement intéressant ici, dans les communications croisées qui ont été observées pour l'instant, l'activation de la signalisation IGF1-AKT peut être réalisée par un signal mécanique (WANG, CHANG et al. 2008). En effet, via l'intégrine  $\beta$ 1 et l'*integrin-linked kinase* (ILK), le récepteur d'IGF-1 est phosphorylé et la voie IGF1-AKT est activée dans les cellules du muscle squelettique.



**Figure 1.7 La régulation de la masse musculaire est sous contrôle de la voie de signalisation IGF1-AKT**

(A) Boucle de rétrocontrôle de la signalisation IGF1-AKT (en rouge) et action indirecte sur mTORC1 (en pointillé). (B) Facteurs et autres voies qui affectent la signalisation IGF1-AKT (en rouge). (Adaptée de Schiaffino et al., 2011).

La voie des *mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated receptor kinase* (MAPK/ERK) a aussi été impliquée dans la régulation de la croissance musculaire (SCHIAFFINO ET MAMMUCARI 2011). Il a été observé chez l'Homme une augmentation d'IGF-1Ea et d'IGF-1Ec, deux isoformes d'IGF-1 aussi nommées MGF (*mechano growth factor*), à la suite d'un exercice intense. Leurs mécanismes d'action diffèrent puisqu'une stimulation des cellules C2C12 par ces deux isoformes d'IGF-1 n'est pas inhibée par la neutralisation du récepteur d'IGF-1. De surcroît, la stimulation des C2C12 avec MGF n'entraîne pas l'activation d'AKT. Les auteurs ont posé l'hypothèse que les patrons d'expression des isoformes pourraient agir comme des mitogènes distincts lors de la régénération musculaire (PHILIPPOU, PAPAGEORGIOU et al. 2009).

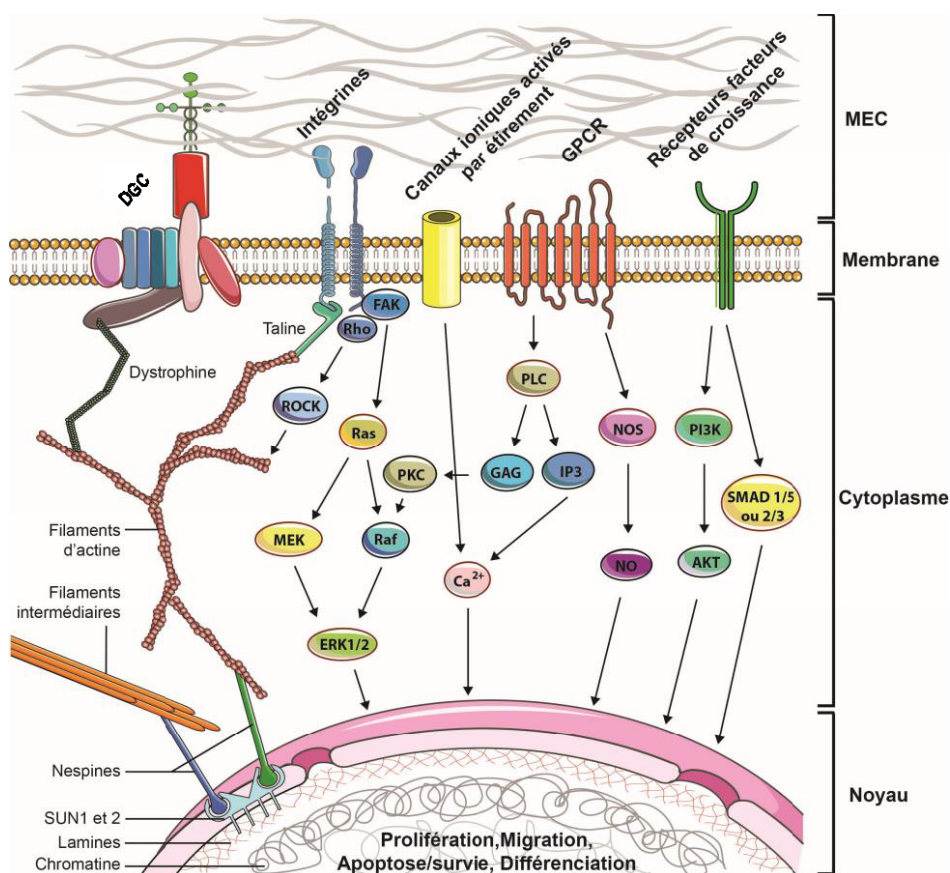
D'autres chercheurs attirent notre attention sur les différences de réponse d'une stimulation des cellules musculaires à l'IGF-1, en fonction du contexte et de

l'environnement cellulaire (OH ET KIM 2013; PIERNO, CAMERINO et al. 2013). En effet, Oh et Kim ont montré qu'une signalisation réduite de l'IGF-1, prévient la mort cellulaire dans le muscle. Leur étude indique que la modulation de la voie de signalisation de l'IGF-1 pourrait devenir une stratégie thérapeutique dans le traitement de la dystrophie musculaire.

### 1.2.2 La mécanotransduction

La mécanotransduction est le processus qui permet aux cellules de répondre aux stimuli mécaniques de son microenvironnement. Contrairement aux objets solides, les cellules, sont sujettes à des contraintes qui se répercutent en déformant leurs cytosquelettes. Ce stress mécanique extérieur induit un stress intracellulaire en retour. C'est cet équilibre dynamique entre les contraintes externes et internes qui provoque ou bloque les cascades de signalisations biochimiques qui mènent à la réponse cellulaire (LIU ET LEE 2013). Ceci dit, la mécanotransduction provoque des réponses variées. Elle peut moduler la synthèse protéique, la sécrétion, l'adhésion, la migration, la prolifération, la différenciation et l'apoptose des cellules.

Les cellules sont dotées de plusieurs mécanosenseurs pour percevoir les divers stimuli mécaniques (complexes d'adhésion focaux, cil primaire, certains canaux ioniques, etc.), quels que soient leur nature; étirement/compression, morphologie/texture, flux de cisaillement de fluide ou encore rigidité du substrat (**Figure 1.8**). Bien entendu, la réponse cellulaire dépendra de son type, de la combinaison de l'intégration des divers mécanosenseurs et du contexte environnemental de la cellule en question (KATSUMI, ORR et al. 2004; INGBER 2006). Par exemple, il est connu que des forces d'étirements ou de cisaillements causées par des fluides peuvent activer les trois sentiers de signalisation des MAPK/ERK, JNK et p38.



**Figure 1.8 Principales voies de signalisation de la mécanotransduction**

Les forces mécaniques présentes dans l'environnement de la cellule sont transmises au cytosquelette de la cellule par l'intermédiaire de complexes membranaires (e.g. DGC ou intégrines). Les modifications mécaniques du microenvironnement de la cellule peuvent être converties en signal biochimique en déclenchant l'activation de nombreuses cascades de signalisation dans le cytoplasme. Ces signaux peuvent alors moduler l'expression de gènes impliqués dans le cycle cellulaire, l'apoptose, la migration ou la différenciation de la cellule. Le cytosquelette est également couplé au noyau par l'intermédiaire des « nesprines » qui interagissent avec des protéines de la membrane nucléaire (SUN1 et SUN2) qui sont associées aux lamines. Les lamines se lient alors à la chromatine et modifient l'activité transcriptionnelle. En somme, les altérations mécaniques du microenvironnement peuvent se transmettre de la MEC directement au noyau. Pour la clarté du schéma, toutes les interactions possibles entre les voies de signalisation n'ont pas été représentées. Les voies de signalisation indiquées ont été identifiées dans divers types cellulaires, dont les cellules du muscle (Adaptée de Frédéric Trenz, *Influence de l'environnement biochimique et biomécanique sur les cellules souches du muscle squelettique*, thèse de doctorat, 2013, FMSS, Université de Sherbrooke).

Des cycles d'étirements appliqués aux cellules C2C12, causent leur prolifération et inhibent leur différenciation, par le biais de la phosphorylation de p38 et de la diminution de la phosphorylation de ERK (KOOK, LEE et al. 2008). Une autre étude a montré que les



cycles d'étirements sur les C2C12 avaient plutôt pour conséquences d'augmenter la phosphorylation des trois sentiers de signalisation des MAPK (NAKAI, KAWANO et al. 2010). Ces résultats contradictoires pour un même type cellulaire s'expliquent par des différences d'amplitude, de puissance et de durée des étirements appliqués (BENAVIDES DAMM ET EGLI 2014).

Outre les intégrines et les canaux ioniques mécanodépendants, bien d'autres molécules en lien avec les points d'adhésions des cellules (cellule-cellule ou cellule-MEC) ont été identifiées comme mécanosenseurs, comme par exemple les cadhérines, certains membres de la superfamille des immunoglobulines (e.g. *Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1* [PECAM-1 ou CD31]) et *intercellular Adhesion Molecule-1* (ICAM-1).

Les modifications possibles de la mécanotransduction en fonction du vieillissement ne sont que peu comprises à ce jour. En effet, il semble que la capacité des cellules à sentir, intégrer et répondre aux stimuli mécaniques soit altérée avec l'âge provoquant des dommages mécaniques, l'apoptose et la dérégulation de l'expression génique (WU, FANNIN et al. 2011). Les études commencent à peine à s'accumuler sur le sujet vu les difficultés techniques rencontrées dans l'élaboration de modèles d'études et la complexité d'interprétation de l'intégration des signaux mécaniques par les divers mécanosenseurs. Plusieurs tissus manifestent d'eux-mêmes une certaine rigidité (DISCHER, JANMEY et al. 2005) qui varie tout au long du développement d'une pathologie ou durant le développement (LADOUX ET NICOLAS 2012).

Dans la dernière décennie, les chercheurs ont développé divers modèles pour comprendre les capacités de perception de la rigidité du substrat qu'ont les cellules. Ainsi en 2002, l'équipe de Mooney observait un lien entre la rigidité du substrat, la prolifération et la différenciation des cellules C2C12 (ROWLEY ET MOONEY 2002). Puis, un modèle plus raffiné permit d'associer l'organisation du cytosquelette de CPM de souris à des rigidités spécifiques (ENGLER, GRIFFIN et al. 2004). Boonen *et al.* ont par la suite pu établir des niveaux de rigidités spécifiques capables d'influencer la prolifération et la différenciation de CPM de souris (BOONEN, ROSARIA-CHAK et al. 2009). Une étude phare récente a montré que le conditionnement de CPM sur des substrats d'une rigidité connue, soit celle du muscle (12 kPa), avait un effet positif sur l'intégration des cellules une fois transplantées dans un muscle endommagé (GILBERT, HAVENSTRITE et al. 2010). Les différences ou

apparentes contradictions entre ces études s'expliquent par la sensibilité des techniques visant à mesurer les divers paramètres (rigidité des substrats, prolifération, différenciation) et les différences entre les modèles d'étude (types de substrats, protéines de revêtements utilisés). Cela dit, les mécanismes d'intégrations doivent impliquer les intégrines ainsi que le remodelage de l'acto-myosine, car les points d'adhésion focaux et les filaments d'actine sont lourdement affectés par les modifications de rigidité de leurs environnements.

### 1.2.3 Les intégrines et leurs communications croisées

Les intégrines sont des récepteurs transmembranaires qui s'assemblent en hétérodimères (sous unité  $\alpha$  et  $\beta$ ) de façon non covalente. Connues pour être impliquées dans les contacts cellule-MEC, elles participent à l'assemblage des points d'adhésion focaux (FA). Les FA sont issus de structures plus simples qui unissent les intégrines au cytosquelette. L'adhésome des intégrines est constitué de 156 protéines qui sont, soit partie intégrante des sites d'adhésion, soit seulement transitoirement associées pour influencer la structure et/ou l'activité signalétique de ceux-ci (KIM, TURNBULL et al. 2011). En plus d'effectuer un lien mécanique avec le cytosquelette, elles permettent aussi l'intégration de la signalisation de la MEC vers le noyau cellulaire. Jusqu'à maintenant 18 sous-unités  $\alpha$  et 8 sous-unités  $\beta$  sont connues pour s'associer en 24 différents dimères. Leur diversité est aussi augmentée par la présence d'isoformes de chaque sous-unité.

Dans le muscle, les intégrines ont un rôle majeur à jouer dans la différenciation des cellules du muscle. On sait que la forme  $\alpha_5\beta_1$  a comme ligand la fibronectine alors que l' $\alpha_6\beta_1$  et l' $\alpha_7\beta_1$  lient exclusivement la laminine. L'expression de l' $\alpha_5\beta_1$  et de l' $\alpha_6\beta_1$  est diminuée suite à la formation de myotubes et celle de l' $\alpha_7\beta_1$  est restreinte aux muscles squelettique et cardiaque (MAYER 2003). Un des premiers événements signalétiques suite à un signal extracellulaire modulé par les intégrines est l'activation des tyrosines kinases SRC et FAK. Cette étape stabilise et amplifie l'activation du complexe SRC-FAK. Src peut phosphoryler FAK, mais aussi bien d'autres partenaires en aval pour mener à l'activation du sentier JNK des MAPK. En ce qui concerne FAK, ces cibles sont d'abord les RHO-GTPase (RAC, CDC42 et RHOA) qui modulent le lien entre les sites d'adhésion et le dynamisme des filaments d'actine. L'activation de FAK mène aussi au recrutement au FA de PI3K qui active subséquemment AKT et module la réponse de survie cellulaire. Comme le complexe intégrine-SRC-FAK active la voie des MAPK, on pouvait prévoir une

éventuelle signalisation croisée. En effet, il a été montré que MEK1 et RAF1 constituent des points de convergences importants entre les signalisations des intégrines et des facteurs de croissance (KIM, TURNBULL et al. 2011). De plus, la modulation des sentiers ERK et p38 a été reliée à l'activation du complexe SRC-FAK suite à une stimulation par tensions intermittentes (KATSUMI, ORR et al. 2004).

#### **1.2.4 La composition de la matrice extracellulaire**

Certaines études ont montré une augmentation de la quantité totale de collagènes dans le muscle âgé en comparaison avec le muscle jeune ou adulte (ALNAQEEB, AL ZAID et al. 1984; GOSSELIN, ADAMS et al. 1998). D'autres n'ont pas observé d'augmentation (HAUS, CARRITHERS et al. 2007), probablement dû aux différences dans l'âge et la souche de souris étudiée. Bien qu'il n'y ait pas de consensus sur l'accumulation de collagène dans la MEC avec l'âge, les chercheurs s'entendent sur l'augmentation de liaisons croisées (ou réticulation) dans le collagène de la MEC (TAKAHASHI, HOSHINO et al. 1995; HEIN ET FRANKE 2002; REDDY 2004; RUSTER, FRANKE et al. 2005; HAUS, CARRITHERS et al. 2007). En fait, il y a deux types de réticulations: le premier type de réticulation est sous contrôle enzymatique (lysyl oxydase) et peut être stimulée par l'exercice (DUCOMPS, MAURIEGE et al. 2003). Le deuxième type est une réticulation non-enzymatique (appelée glycation) qui résulte de la réaction d'un sucre (eg. glucose, ribose) avec un groupement amine d'un acide aminé (BAILEY 2001). Cette dernière est connue pour être augmentée chez les diabétiques (MONNIER, BAUTISTA et al. 1999; REDDY 2004). Les produits finaux des réticulations non-enzymatiques sont appelés « *advanced glycation end-products* » (AGE) et peuvent être issus d'un enchainement plus ou moins simple de substrats.

#### **1.2.5 Les propriétés biomécaniques de la matrice extracellulaire**

Les principaux rôles de la MEC sont le maintien de la structure et la transmission des forces induites par la contraction à l'ensemble du muscle (KJAER 2004). La MEC participe à la régénération musculaire (KAARIAINEN, JARVINEN et al. 2000) et par conséquent, adapte ses propriétés mécaniques (e.g. élasticité, rigidité). Plusieurs études ont montré une augmentation de la rigidité du muscle squelettique en lien avec diverses modifications quantitatives et qualitatives de la MEC (ALNAQEEB, AL ZAID et al. 1984; GOSSELIN, ADAMS et al. 1998; GAO, KOSTROMINOVA et al. 2008; KRAGSTRUP, KJAER et al. 2011). Bien qu'il

soit difficile de relier la rigidité à une modification de la MEC en particulier, une corrélation a été établie avec l'augmentation du collagène et l'augmentation de la réticulation du collagène avec l'âge (BAILEY, PAUL et al. 1998). De plus, il semble que la réticulation du collagène matriciel avec l'âge cause une diminution de la souplesse dans les articulations et l'augmentation de la rigidité du système vasculaire et rénal (BAILEY 2001). Il a été également observé que l'inhibition de l'enzyme lysyl oxydase, qui est responsable de la réticulation enzymatique, provoquait une diminution de la tension passive et un déficit des forces isométriques du muscle (WILLEMS, MILLER et al. 2001). D'ailleurs, après avoir observé une diminution des forces isométriques en corrélation avec l'augmentation des AGE, l'équipe de Trappe (HAUS, CARRITHERS et al. 2007) ont posé l'hypothèse que la réticulation du collagène serait la principale cause de la détérioration des propriétés mécaniques du muscle squelettique.

### 1.3 Étude de la rigidité

Avant tout, une clarification sur la définition de la rigidité s'impose. Nous la définirons en opposant liquide et solide. Suite à une compression, le liquide sera amené à se déplacer de l'endroit d'où provient la force tandis que le solide a l'habileté de résister en offrant une poussée dans le sens opposé de la force qu'il subit. En d'autres termes, le solide offre une résistance à la déformation. L'élasticité quant à elle inclue à la fois la résistance à la déformation et la capacité du matériau à reprendre sa forme originelle.

Dans un tissu, c'est principalement l'assemblage des cellules adhérentes et de la MEC qui établissent sa rigidité. On sait maintenant que les cellules perçoivent la rigidité de leur environnement en effectuant des tractions par l'intermédiaire de leurs FA (points d'adhésion focaux) (DISCHER, JANMEY et al. 2005). Bien que les voies de signalisations impliquées soient partiellement connues, les cellules musculaires, les neurones et bien d'autres types cellulaires ont démontré les mêmes capacités à interpréter les modifications de rigidité dans le substrat (WANG, DEMBO et al. 2000; DEROANNE, LAPIERE et al. 2001; ENGLER, BACAKOVA et al. 2004). Comme la MEC est en partie responsable de la rigidité des tissus et que celle-ci est modifiée par le vieillissement, par les blessures et par la maladie, son impact sur la modulation phénotypique des cellules est depuis un moment un domaine d'intérêt pour plusieurs (ENGLER, CARAG-KRIEGER et al. 2008; DISCHER, MOONEY

et al. 2009; GILBERT, HAVENSTRITE et al. 2010; BANKS, MOZDZEN et al. 2014; WEN, VINCENT et al. 2014)

### **1.3.1 Les techniques d'élaboration de matrices de rigidité variables**

La mécanobiologie est un champ d'études qui inclut l'élaboration *in vitro* de substrat de rigidité représentative et contrôlée, la diversité des réponses cellulaires, l'effet des modèles 2D versus 3D, l'influence des protéines d'adhésion (DISCHER, JANMEY et al. 2005). L'élaboration de modèles *in vitro* 2D renferme tout de même quelques difficultés techniques qui ont orienté les chercheurs vers certains matériaux. Bien sûr, les composantes utilisées doivent être inertes pour ne pas influencer les réponses cellulaires, être chimiquement malléables afin d'obtenir une gamme de rigidités désirées et, doivent pouvoir être revêtus de protéines (eg. collagène).

#### **1.3.1.1 Hydrogels de polyacrylamides**

L'acrylamide et le bis-acrylamide sont des molécules hautement neurotoxiques (PENNISI, MALAGUARNERA et al. 2013). Par contre, elles sont inertes lorsqu'elles sont polymérisées. Les hydrogels de polyacrylamide sont les plus utilisés pour la culture cellulaire sur des substrats de rigidités contrôlées. De plus, on peut en fonctionnaliser la surface avec les protéines de notre choix en étant assuré d'une densité constante et indépendante de la rigidité (ROWLANDS, GEORGE et al. 2008).

Le principal avantage des hydrogels de polyacrylamide (PA) reste encore la simplicité de sa réalisation technique puisqu'il s'agit des mêmes étapes que pour la réalisation d'un gel d'électrophorèse. Toutefois, cet hydrogel a le désavantage de recréer seulement des environnements 2D (KRANING-RUSH ET REINHART-KING 2012).

#### **1.3.1.2 Autres types de gels**

Les gels de collagènes ont été utilisés pour étudier les effets de la rigidité sur les cellules (ENGLER, BACAKOVA et al. 2004). Ils n'ont pas le même désavantage que ceux de polyacrylamide, c'est-à-dire qu'il est possible de les utiliser pour l'élaboration de modèles 3D. C'est d'ailleurs pour cette raison qu'on les utilise encore aujourd'hui. La MEC ayant comme constituant majoritaire le collagène, ces gels permettent de créer des modèles se rapprochant de la réalité. De plus, le collagène n'est pas cytotoxique. Ceux-ci permettent une mise en culture à l'intérieur comme à la surface des gels, puis permettent aux cellules

de migrer à l'intérieur ou de contracter le gel sur lequel elles évoluent (BROWN 2013). Ceci dit, il n'est pas possible d'établir facilement une rigidité précise comme la polymérisation n'est pas aussi uniforme que pour les gels de polyacrylamide. Enfin, les possibilités de protéines de revêtement sont très limitées tant au niveau de la densité que de l'uniformité. Pour toutes ces raisons, ce matériel est plus utile pour étudier un comportement comme la motilité cellulaire ou encore l'interaction d'un récepteur spécifique au collagène et sa signalisation.

Les alginates sont très utilisés en ingénierie tissulaire. Isolés d'algues brunes, les alginates sont constitués de deux polymères de sucre (acide mannuronique et guluronique) qui contribuent différemment à la polymérisation (ROWLEY ET MOONEY 2002). Il est possible de faire varier la rigidité en modifiant le ratio des sucres. La difficulté majeure des alginates est la réversibilité de sa polymérisation ce qui en fait un hydrogel instable. Plus l'hydrogel d'alginate est souple, moins il est stable. De plus, les polymères d'alginates sont sensibles au pH (MALAFAYA, SILVA et al. 2007). Vu leurs propriétés, les gels d'alginates sont plutôt utilisés comme véhicules pour délivrer des drogues, facteurs de croissances ou même des cellules pour améliorer certains processus régénératifs.

### 1.3.2 Les techniques de mesure de rigidité

Plusieurs questions persistent quant aux réponses cellulaires face à leur environnement spatial ou encore la distance de perception des propriétés de leur environnement. La reconnaissance de l'importance de la rigidité du microenvironnement dans le devenir cellulaire a mené au développement de plusieurs méthodes pour la mesurer.

#### 1.3.2.1 Microscopie à force atomique (AFM)

Introduite en recherche en 1986, cette technique est très versatile. Tout d'abord il a deux modes d'opération: statique et dynamique. Dans le mode statique, les forces se traduisent par une déflexion du cantilever (**figure 2.3**) et sont récoltées comme des images de force. Le bruit de fond est obtenu par la multiplication de la constante de ressort du cantilever ( $k$ ) et du niveau de bruit de la mesure. C'est-à-dire que plus la constante «  $k$  » est faible plus on augmente la sensibilité, mais on augmente aussi les risques d'instabilité du cantilever. Comme la déflexion du cantilever doit être significativement plus grande que la déformation de sa pointe ou de l'échantillon, le cantilever doit être plus souple que les

forces d'attraction entre les atomes de sa pointe et ceux de l'échantillon (BINNIG, QUATE et al. 1986). Pour s'assurer d'une résolution atomique, on doit annuler les forces d'attraction longue-distance en immergeant la pointe du cantilever et l'échantillon. Certains chercheurs sont arrivés à annuler ces forces en appliquant un champ électromagnétique sur le cantilever, mais ils n'arrivaient pas à conserver cette résolution avec tous les types d'échantillons.

Pour le mode dynamique, on fait vibrer le cantilever avec une amplitude et une fréquence constantes. Lorsque la pointe s'approche de l'échantillon, les interactions élastiques et inélastiques modifient son amplitude et sa fréquence. Ce sont ces changements qui deviennent les signaux interprétés par l'appareil. Ce mode n'impliquait pas de contact avec l'échantillon au tout début, mais il a été modifié pour permettre un contact et ainsi il est possible aujourd'hui d'interpréter des topographies, forces de friction, gradients de forces électriques et magnétiques (KUZNETSOVA, STARODUBTSEVA et al. 2007).

Il existe des appareils pour mesurer des échantillons de tailles restreintes qui permettent, par un déplacement de l'échantillon au lieu du cantilever, de réduire le bruit de fond. Bien que cet avantage soit perdu avec l'appareil permettant de plus grandes tailles d'échantillons, il est possible d'évaluer non seulement la rigidité de substrat de culture, mais aussi de cellules et de tissus (ENGLER, RICHERT et al. 2004; SALERNO, DANTE et al. 2010), et même l'identification de molécules individuelles à l'échelle atomique (BHUSHAN 2007; ACHARYA, RAMANUJAM et al. 2011).

#### **1.4 Hypothèse de travail et objectifs de recherche**

Les cellules satellites ont pour principales fonctions le développement et la régénération de la portion myogénique du muscle squelettique tout au long de la vie. Elles sont aussi d'un grand intérêt pour la médecine régénérative, notamment pour le traitement des myopathies comme la Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD) puisque la transplantation de cellules modifiées permettrait de contrecarrer l'épuisement de leur réservoir. À cet égard, plusieurs études ont montré que la modification de la rigidité du substrat, sur laquelle elles reposent, peut moduler leur phénotype en favorisant leur prolifération ou encore leur différenciation (Trensz 2015 et Gilbert 2010).

Le muscle squelettique subit diverses transformations en cours de vieillissement. Il y a apparition de fibrose et autres modifications de la MEC, phénomènes connus pour altérer

les propriétés biomécaniques du muscle. Fait intéressant, la capacité régénérative du muscle diminue de façon concomitante. Pour cette raison, nous souhaitons vérifier l'hypothèse que la rigidité de la matrice est modulée au cours du vieillissement et que celle-ci pourrait influencer négativement la capacité régénérative des CPM.

Cette hypothèse sera vérifiée par le biais de trois objectifs:

- 1) Caractériser le contenu en collagène ainsi que la rigidité du muscle squelettique vieillissant par rapport à un muscle adulte.
- 2) Mesurer l'activité myogénique des cellules satellites *ex vivo* dans le le modèle de fibres musculaires individualisées culture.
- 3) Récapituler l'impact de la rigidité sur un modèle *in vitro*.



## 2 MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 2.1 Souris et isolement des muscles squelettiques

Les expériences ont été réalisées sur des souris mâles C57Bl/6 (Charles River, St-Constant, Qc) âgées de 4 mois (adultes) et 24 mois (âgées). Toutes les procédures impliquant ces animaux ont été approuvées par le comité d'éthique institutionnel de protection des animaux de l'Université de Sherbrooke (Protocole No. 133-11). Les prélèvements ont été faits suivant une euthanasie au CO<sub>2</sub> qui était précédée d'une anesthésie par inhalation d'isoflurane (Laboratoires ABBOTT, QC, Canada).

Les muscles isolés ont été le tibialis antérieur (TA), le long extenseur des doigts (EDL) et/ou le quadriceps (Quad). Les muscles ont été prélevés d'une extrémité à l'autre, i.e. de tendon à tendon, en prenant soin de retirer les fascias. À partir de ces muscles, nous avons soit isolé les cellules primaires, effectué des mesures en microscopie à force atomique (AFM), fait des essais biochimiques, ou encore, réalisé des études histologiques.

### 2.2 Histologie et coloration histologique

Les muscles préalablement fixés à la formaline ont été cirulés (Tissue-TEK VIP 2000, Miles Diagnostics, VA, USA) et inclus en paraffine (Leica EG 1160, Leica Microsystems Inc., ON, Canada). Des coupes de 4 µm ont été obtenues à l'aide d'un microtome (RM2235, Leica Microsystems, Wetzlar, Allemagne). Ces coupes ont été réhydratées par des bains successifs de toluène, d'éthanol et d'eau distillée puis colorées au trichrome de Masson. Ces coupes colorées ont ensuite été déshydratées et montées entre lame et lamelle dans du Permount™ (Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada), comme décrit antérieurement (TRENZ, HAROUN et al. 2010; LEBLANC, TRENZ et al. 2011). Les microphotographies numériques ont été obtenues par un lecteur de lames (Nanozoomer 2.0 RS series; Hamamatsu Photonics, Japan) de La Plateforme d'Histologie et de Microscopie Électronique de l'université de Sherbrooke et les mesures de quantification par le logiciel NDP.view2 (Hamamatsu Photonics, Japan).

### 2.3 Immunomarquages

Les immunofluorescences ont été réalisées sur des fibres musculaires individualisées et sur des cellules en culture. Les cellules ont d'abord été fixées au Paraformaldehyde 4 %

(PFA) (4°C, 10 min), bloquées et perméabilisées dans du PBS contenant 10 % (v/v) de sérum de chèvre, 1 % (p/v) d'albumine bovine sérique (BSA; New England Biolabs, MA, USA) et 0,2 % (v/v) Triton X100 (EMD, NJ, USA) pendant 1 h à température pièce (TP). Les préparations ont ensuite été incubées en présence d'anticorps primaires dilués dans la solution de blocage. Les anticorps primaires utilisés et les temps d'incubation sont présentés dans le **Tableau 2.1**. Après trois rinçages au PBS contenant 1% (v/v) de Tween-20 (Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada), les préparations ont été incubées 1 h avec des anticorps secondaires dans la solution de blocage, tel que décrit au **Tableau 2.2**. Les noyaux des cellules ont été marqués avec le DAPI (4',6'-diamidino-2- phénylindole; 0,5 µg/ml; Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada). Le dénombrement des cellules a été fait en comptant le nombre de noyaux marqués au DAPI.

**Tableau 2.1 Anticorps primaires utilisés en immunofluorescence**

Anticorps primaires	Espèce et Isotype	Immunogène Clone	Type	Dilution	Origine	Cellule ou structure marquée	Temps d'incubation (TP)
<b>Pax7</b>	IgG1 Souris	Poulet	Mono	1:3	DHSB	Cellules satellites quiescentes et CPM prolifératives	90 min
<b>MyoD</b>	IgG Lapin	M-318	Poly	1:1500	Santa Cruz (#sc-360)	CPM prolifératives	90 min
<b>Myogénine</b>	IgG1 Souris	Rat ; F5D	Mono	1:3	DSHB	CPM différenciées	90 min
<b>Ki67</b>	Lapin	Peptide synthétique, SP6	Mono	1:100	Abcam (#ab16667)	Cellules prolifératives	90 min
<b>Chaîne lourde de la Myosine;</b>	IgG2b Souris	MF20	Mono	1:10	DSHB	CPM différenciées	120 min

\*Developmental Studies Hybridoma Bank.

**Tableau 2.2 Anticorps secondaires utilisés en immunofluorescence**

Anticorps secondaires	Isotype reconnu	Espèce reconnue	Dilution	Numéro de catalogue*
Alexa-Fluor® 488	anti IgG1	Souris	1:1000	A21121
Alexa-Fluor® 488	anti IgG H+L	Lapin	1:1000	A11008
Alexa-Fluor® 594	anti IgG H+L	Lapin	1:1000	A11012
Alexa-Fluor® 594	anti IgG H+L	Rat	1:1000	A11007
Alexa-Fluor® 594	anti IgG H+L	Souris	1:1000	A11005

\*Tous les anticorps secondaires proviennent de la compagnie Life Sciences (Invitrogen, Burlington, ON, Canada)

#### 2.4 Quantification du collagène du muscle squelettique

Le collagène du muscle squelettique a été quantifié par un essai biochimique détectant l'hydroxyproline, un acide aminé particulièrement enrichi dans le collagène (SHIGEMURA, KUBOMURA et al. 2014). Brièvement, les muscles congelés dans l'azote liquide ont été réduits en poudre à l'aide d'un mortier puis lyophilisés permettant ainsi de mesurer la masse sèche du tissu. Les poudres de tissus ont été hydrolysées pendant 4 h à 110°C à l'aide d'une solution de HCl 6N, suivi d'une évaporation durant toute la nuit. Le produit a ensuite été solubilisé à l'aide de NaOH 4N puis exposé à la Chloramine T (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) (20 min, TP). Une solution de p-diméthylaminobenzaldéhyde a été ajoutée puis incubée (7 min, 65°C). Des solutions standard de trans-4-hydroxy-L-proline (HYP; Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) ont été fournies pour réaliser une courbe standard. Les concentrations d'hydroxyproline ont été déterminées par spectrophotométrie à 560 nm et normalisées à la masse de tissu sec pour chaque échantillon (EDWARDS ET O'BRIEN 1980).

#### 2.5 Quantification des produits de glycation avancé (AGE) du muscle squelettique

Les AGE sont considérés comme des biomarqueurs du vieillissement (NASS, VOGEL et al. 2010). Ils ont été quantifiés dans le muscle squelettique par le biais d'un essai biochimique détectant l'ensemble des AGE, tel que décrit par le manufacturier (*OxiSelect*<sup>TM</sup>

*Advanced Glycation End Product (AGE) Competitive ELISA Kit*, cat.: STA-817, Cell BioLab inc., San Diego, CA, USA). Brièvement, les protéines ont été extraites en solubilisant les muscles lyophilisés dans un tampon de lyse RIPA (50 mM Tris-HCL, 150mM NaCl, 0,1% Sodium Désoxycholate, 0,5% NP-40, supplémenté d'inhibiteurs de protéases [Roche Diagnostics, cat.: 11 836 170 001, Mannheim, Germany]) et en centrifugeant 10 min (13 200 rpm, 4°C). Préalablement à l'extraction protéique, les puits de la plaque d'ELISA ont été traités avec une solution 1:1 de diluent à conjuguer et d'AGE conjugué 10 mg/ml. Avant l'expérience, on a retiré des puits l'AGE conjugué, lavé à deux reprises au PBS et bloqué durant une heure avec le diluent du kit. Par la suite, une courbe standard d'AGE-BSA a été élaborée de 0 à 100  $\mu\text{g/ml}$ , de façon à définir l'unité (U) comme 1  $\mu\text{g}$  d'AGE-BSA. Les standards et les échantillons de protéines, traités en duplicatas, ont ensuite été disposés dans les puits et incubés à TP durant 10 min. L'anticorps d'AGE dilué de l'essai a été ajouté et incubé 1 heure, suivi de trois lavages avec le tampon d'essai. L'anticorps secondaire couplé à l'HRP (Horseradish Peroxydase) a été ajouté à chaque puits suivi aussi de trois lavages. Le substrat d'HRP a été ajouté et la réaction fut arrêtée après quatre minutes avec la solution d'arrêt de l'essai.

## **2.6 Isolement et culture des fibres musculaires**

Les fibres musculaires ont été isolées à partir du muscle EDL comme décrit antérieurement (BISCHOFF 1986) et adapté par notre laboratoire (TRENZ, HAROUN et al. 2010; TRENZ, LUCIEN et al. 2015). Brièvement, les muscles ont été digérés à 37°C dans une solution de collagénase de type I (1 mg/ml; Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) préparée dans le Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Wisent Inc., QC) contenant 10% de sérum de veau fœtal (FBS) et 1 % d'antibiotiques (Pénicilline-Streptomycine, Wisent Inc). La digestion a été effectuée dans un bain-marie à 37°C pendant 60 à 90 min. À tous les 15 min, les tubes étaient agités par inversion afin de percevoir le détachement des fibres. Suite à cette digestion, les muscles étaient transférés dans un pétri avec du milieu favorisant la prolifération des myoblastes (GM; growth medium) qui était constitué de HamF10 (Gibco, Burlington, ON, Canada), 20% de FBS, 2,5 ng/ml de bFGF et 1% d'antibiotiques. Les fibres ont été ensuite récoltées une à une à l'aide d'une pipette Pasteur, enduite de sérum de cheval (HS, Horse Serum, Hyclone) et dont l'embout avait été poli à la flamme. Les fibres furent transférées dans des pétris successifs afin d'éliminer les débris

cellulaires et tissulaires générés durant la digestion. Afin de s'assurer d'éliminer de possibles cellules contaminantes (e.g. fibroblastes), une dernière digestion de 15 min à la collagénase de type 1 a été effectuée à 37°C. Les fibres individualisées ont été alors utilisées soit pour la culture cellulaire, pour des mesures en AFM ou encore fixées à l'aide de PFA 4% (PFA; Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) 10 min à 4°C pour les études d'immunomarquages.

## **2.7 Isolement, culture et différenciation en myotubes des cellules progénitrices myogéniques**

Les cellules progénitrices myogéniques (CPM), ou les myoblastes, ont été enrichies et isolées à partir de fibres musculaires individualisées mises en culture comme décrit antérieurement (TRENSZ, LUCIEN et al. 2015). Après 6 jours, les fibres ont été triturées par aspiration/projection sur la paroi du pétri à l'aide d'une pipette Pasteur de façon à déloger mécaniquement les CPM des fibres. Les cellules récupérées ont été centrifugées (5 min, 300 g, 4°C), le culot repris dans du GM frais, puisensemencées dans des pétris revêtus de collagène (Rat tail collagen; cat: 08-115, Millipore, Temecula, CA, USA) afin de favoriser leur adhésion et leur prolifération.

Pour évaluer leur capacité proliférative, les CPM sontensemencées à une densité de 2000 cellules/cm<sup>2</sup> et cultivées dans le GM. Les décomptes ont été faits à trois jours et demi de culture, à l'aide d'un hématimètre de Neubauer. Le calcul du PD (doublement de population) a été réalisé avec l'équation suivante :

$$X = \frac{[\log_{10}(\phi_f) - \log_{10}(\phi_i)]}{\log_{10}(2)}$$

où  $\phi_f$  est le nombre de cellules récoltées,  $\phi_i$  le nombre initial de cellules. Les décomptes ont été faits pour chaque passage ce qui nous a permis d'obtenir le PD cumulatif (CPD ou doublement de population cumulatif) (GRENIER, REMY-ZOLGHADRI et al. 2003).

Le potentiel de différenciation a été évalué comme décrit antérieurement (TRAVAGLIONE, MESSINA et al. 2005). Brièvement, lorsque les CPM ont atteint une confluence élevée, le GM a été remplacé par un milieu de différenciation constitué de DMEM contenant 5% sérum de cheval (HS) (DM, differentiation medium). Après trois jours de culture dans un milieu appauvri en facteurs de croissance, les myoblastes fusionneront pour former des cellules multinucléées appelées myotubes. La qualité de la

différenciation a été évaluée selon l'index de fusion, où l'on dénombre le nombre de cellules positives immunomarquées à la chaîne lourde de la myosine (MHC) contenant plus de deux noyaux (préalablement colorés au DAPI).

## **2.8 Fabrication d'hydrogels en polyacrylamide permettant de moduler la rigidité du substrat des cellules en culture**

Les hydrogels en polyacrylamides ont été conçus à partir de protocoles existants (CRETU, CASTAGNINO et al. 2010; TSE ET ENGLER 2010). Leur élaboration se résume ainsi: **1)** la conception des lamelles réactives et siliconées, et deux étapes de réalisation : **2)** la polymérisation de mélanges de polyacrylamides entre les deux lamelles et, **3)** le couplage de protéines de revêtement aux hydrogels. Les lamelles utilisées sont circulaires (diamètre de 25 mm)

### **2.8.1 Étape préparatoire: Conception des lamelles réactives et siliconées**

Des lamelles de verre ont été déposées dans un pétri puis recouvertes d'une solution de NaOH 0,1 M durant 3 min. Cette solution est ensuite retirée, les lamelles rincées à l'eau nanopure, exposées au 3-aminopropyltriéthoxysilane (APES) durant 3 min puis suivi d'un rinçage de 10 min à l'eau nanopure. Les lamelles ont ensuite été transférées dans un autre pétri pour rinçage à l'eau distillée sous agitation. Par la suite, les lamelles ont été traitées au glutaraldéhyde 0,5 % pendant 30 min, afin de favoriser l'attachement des hydrogels. Ces lamelles réactives ont subi 3 rinçages de 10 min avant d'être séchées. Parallèlement, autant de lamelles ont été siliconées sous agitation durant 10 min, dans une solution de Surfacil 10 % (Thermoscientific, cat : TS-42800, ON) dans le chloroforme.

### **2.8.2 Étape de réalisation: polymérisation de mélanges de polyacrylamides entre les deux lamelles**

Les substrats de différentes rigidité ont été obtenus en mélangeant diverses proportions d'acrylamide 40% (Sigma-Aldrich, cat : A4058-100ML, MO, USA) et de bis-acrylamide 2% (Sigma-Aldrich, cat: M1533-25ML) dans l'eau nanopure tel que décrit dans le **Tableau 2.3** et placés à 4°C jusqu'à leur utilisation.

**Tableau 2.3 Proportion des constituants utilisée permettant de produire des hydrogels de différentes rigidités**

Élasticité attendue (kPa)	Acrylamide (%)	Bis-acrylamide (%)	Acrylamide 40% (ml)	Bis-acrylamide 2% (ml)	H <sub>2</sub> O distillée & déionisée (ml)
0,5	3	0,06	1,5	0,6	17,9
2	4	0,01	2,0	1,0	17,0
18	8	0,264	4	2,64	13,36

Lors de leur conception, les mélanges de polyacrylamides ont été agités à l'aide d'un vortex et filtré à l'aide de papier filtre de 0,22 µm. Pour chacune des parties aliquotes d'hydrogel, l'ammonium persulfate 10 %, la solution saturée de N-Hydroxysuccinimide (NHS) et le TEMED ont été ajoutés selon les proportions décrites au **Tableau 2.4**. Les hydrogels en polyacrylamide ne permettent pas l'attachement des protéines, ni des cellules. Pour cette raison, ils doivent être revêtus de collagène. Pour y arriver, les hydrogels doivent être préalablement conçus avec une solution de n-hydroxysuccinimide (NHS) (Sigma-Aldrich, cat: 130672-5G, MO, USA) qui agira comme un « pont » en créant des liens covalents entre l'hydrogel et les molécules de collagène.

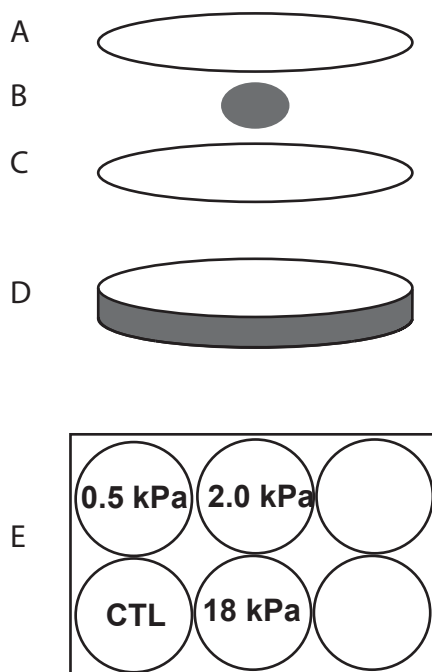
**Tableau 2.4 Proportion des constituants pour former les hydrogels de différentes rigidités.**

Constituants	Quantité (µl/ml)
Mélange de polyacrylamide**	800
Ammonium persulfate 10 %	8
Solution saturée de n-hydroxysuccinimide (NHS)	228
TEMED	1

\*\*Voir Tableau 2.2

Les lamelles réactives ont été déposées sur du parafilm fixé avec du ruban adhésif de façon à ce que les faces traitées soient vers le haut. Sur chaque lamelle réactive, 140 µl d'hydrogel ont été déposés et délicatement recouverts par une lamelle siliconée de façon à

étaler l'hydrogel (**Figure 2.1**). La polymérisation a eu lieu à température pièce durant 20 min. Les hydrogels ont ensuite été délicatement placés dans une plaque 6 puits puis rincés 3 fois au PBS pendant 5 min.



**Figure 2.1 Schéma d'élaboration d'hydrogels en polyacrylamide possédant des rigidités variables**

**A)** Lamelle siliconée. **B)** Goutte de mélange d'hydrogel. **C)** Lamelle réactive. **D)** Diverses composantes assemblées. **E)** prototype de la disposition des hydrogels dans une plaque 6 puits.

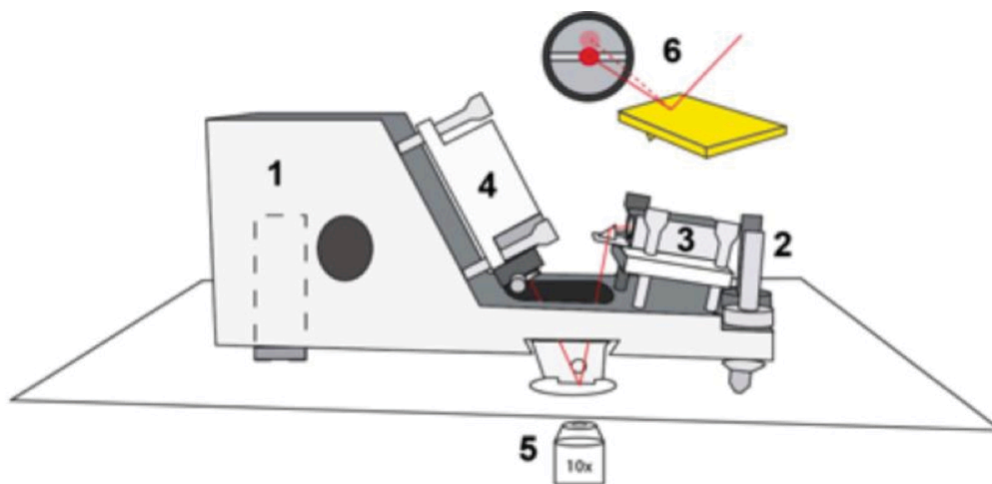
### 2.8.3 Couplage de protéines de revêtement aux hydrogels

Les hydrogels conçus avec le n-hydroxysuccinimide ont été recouverts toute une nuit à 4°C par une solution de collagène solubilisée dans l'eau acidifiée. Afin de saturer les sites NHS qui pourraient être libres, les hydrogels revêtus de collagène ont été immergés durant 50 min à 37°C dans une solution d'albumine (1 mg/ml; Endotoxin free BSA, cat: 126579, EMD Millipore, Gibbstown, NJ, USA) diluées à l'aide de milieu Ham's F10. Un rinçage de 5 min au PBS a été effectué avant la mise en culture des cellules sur les hydrogels. L'uniformité du revêtement a été validée en microscopie à fluorescence par le biais d'un revêtement où le collagène de type 1 avait été préalablement couplé à un fluorochrome (Immune Biosolutions Inc., Atto-Tec labels and dyes, QC, Canada) (**Figure 3.6**).



## 2.9 Microscopie à force atomique (AFM)

Les mesures de rigidités ont été obtenues à l'aide d'un microscope à force atomique (AFM) (**Figure 2.2**). L'AFM est l'assemblage d'un microscope et d'un levier, appelé cantilevier, sur lequel un laser est réfléchi sur une photodiode. Lorsque ce levier fait contact avec l'échantillon, il subit alors une déflexion qui déplace le laser sur la photodiode. Cette variation (ou indentation) permet le calcul d'une courbe force/distance (F/D) qui peut être transformée par le biais d'un algorithme en module de Young (KUZNETSOVA, STARODUBTSEVA et al. 2007) (**Figure 2.3**). Les multiples indentations ont été faites à l'aide d'un AFM équipé d'un piezo à axe z de 25 $\mu$ m, d'un cantilevier ( $k=0.05$  N/m ; MLCP, Buker AFM probe, USA) et d'un microscope inversé (Carl Zeiss, Germany) équipé d'une caméra pour vérifier le positionnement du levier sur les diverses préparations (SIMARD, SOLLRADL et al. 2015).



**Figure 2.2 Schéma du montage de l'AFM**

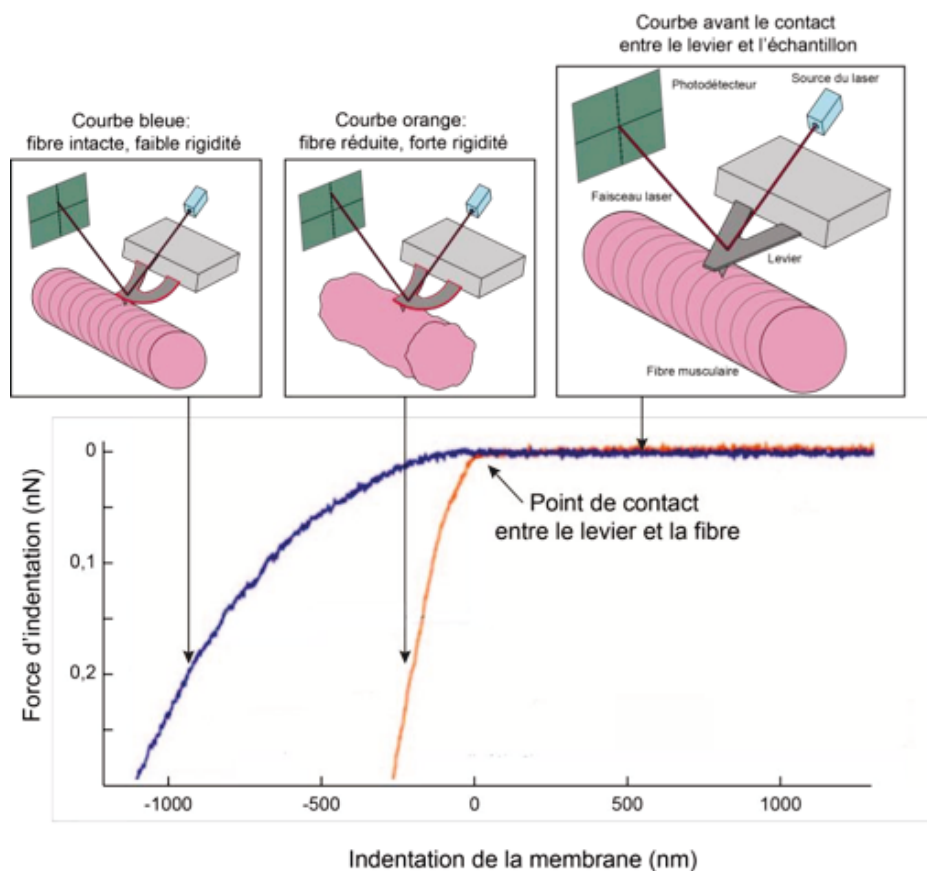
1) Piezo à axe z de 25  $\mu$ m; 2) microvis permettant d'abaisser l'AFM; 3) laser; 4) photodiode segmentée; 5) microscope inversé; 6) effet du mouvement du levier par la déflexion du faisceau laser sur la photodiode. Adapté de (Söllradl et al., non publiée).

Avant chaque expérience, le cantilevier a été calibré par 5 mesures au contact d'une lamelle de verre pour évaluer sa constante de raideur ( $k$ ) en tenant compte de la constante nominale fournie par le fabricant. Les expériences ont été réalisées à température pièce. Les valeurs de rigidité (module de Young) ont été établies en faisant la moyenne de 3 mesures d'indentation, i.e. à partir de 3 courbes F/D, puis analysées par un logarithme

semi-automatique sur MatLab (MathWorks, USA) à partir d'un modèle de Hertz modifié pour un indentateur pyramidal à 4 côtés et calculées selon l'équation suivante:

$$F = \frac{E}{1 - \nu^2} \frac{(\tan \alpha)}{\sqrt{2}} \delta^2$$

où  $F$  est la force d'indentation,  $E$  le module de Young,  $\nu$  le ratio de Poisson (défini à 0,5 pour les matériaux incompressibles isotropiques),  $\delta$  l'indentation, et  $\alpha$  l'angle de face de la pyramide (17,5° pour le levier utilisé). Afin d'obtenir une résolution élevée, 65 points d'analyse ont été déterminés pour chaque courbe ce qui correspond à 15 nm/point. L'algorithme permettait ensuite d'obtenir une courbe profondeur d'indentation vs module de Young ( $\delta/E$ ) pour chaque point d'analyse.



**Figure 2.3 Illustration des types de courbes F/D obtenues en fonction du type d'échantillon**

(Adaptée de Frédéric Trenz, *Influence de l'environnement biochimique et biomécanique sur les cellules souches du muscle squelettique*, thèse de doctorat, 2013, FMSS, Université de Sherbrooke).

Pour choisir une courbe représentant la valeur absolue de rigidité de la fibre analysée, trois critères ont été pris en compte:

1. La courbe horizontale la plus profonde (module de Young vs. Profondeur d'indentation).
2. Le point de départ de la courbe passant par le point de contact.
3. Le fait que si deux courbes, ou plus, partagent la même profondeur d'indentation, celle avec le plus petit RMSD (*root mean square deviation*) était sélectionnée.

Ces critères ont été utilisés pour s'assurer que les modules de Young obtenus étaient en accord avec le modèle utilisé et que le point de contact physique correspondait au point de départ d'analyse. Les modules de Young calculés à partir de la courbe F/D sont exprimés en Pascal (Pa).

### **2.9.1 Mesure en AFM sur des coupes sagittale de muscles frais**

Les muscles tibialis antérieur (TA) ont été inclus dans un gel d'agarose à 2 % à bas point de fusion (Gibco, Burlington, ON, Canada). Les tissus enrobés ont été immergés dans un tampon phosphate 0.1 M puis tranchées en section de 100  $\mu\text{m}$  à l'aide d'un vibratome (Vibratome 3000 Plus, Vibratome, MO, USA). Ces fines tranches ont été disposées dans une plaque 6 puits sur des lamelles circulaires avec ruban adhésif double face. Les lamelles ont été centrifugées (500 g durant 8 min) (Hettich Rotina 420R, Newport Pagnell, Royaume-Uni), transférées dans des pétris de culture (Falcon, BD Bioscience) puis recouvertes de milieu CO<sub>2</sub> indépendant, le DMEM L15 (Leibovitz's L15, Wisent inc., QC, Canada). Puis le cantilever était placé au centre des fibres. Outre les fibres cultivées, toutes les mesures en AFM ont été effectuées le jour du prélèvement du muscle.

### **2.9.2 Mesures en AFM sur des fibres musculaires individualisées**

Les mesures sur les fibres fraîchement isolées (non fixées) ont été effectuées le jour même de leur isolement (Jour 0) ou après 6 jours de culture (Jour 6). Elles ont été placées dans les puits de plaque 6 puits recouvert de ruban adhésif double face, centrifugées (400 g, 8 min). Les fibres adhérentes ont ensuite été transférées en bloc, i.e. avec le ruban adhésif, dans des pétris de culture (Falcon, BD Bioscience) pour être finalement utilisées en AFM. Le cantilevier était placé au même endroit que sur les coupes sagittales, soit au centre de la fibre.

## **2.10 Statistiques**

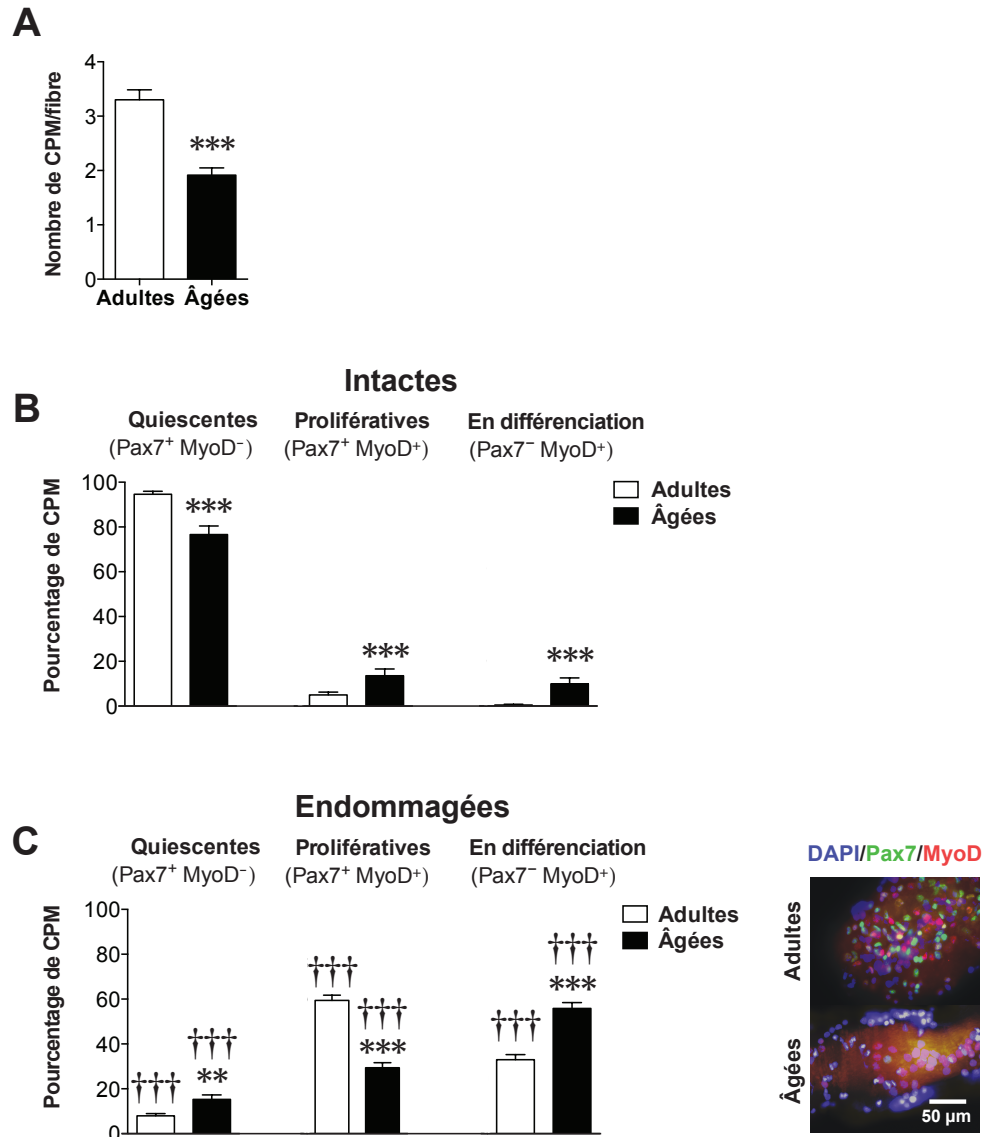
Les analyses statistiques ont été faites par comparaison de moyenne  $\pm$  erreur type de la moyenne (SEM). Pour la rigidité des fibres musculaires et pour le test d'exposition à la mitomycine, les données ont subi une transformation logarithmique pour permettre une analyse de variance à un facteur (one-way ANOVA) suivie du test de comparaisons multiples de Tukey. Des tests-*t* non appariés ont été utilisés lorsque des tissus ou des cellules provenaient de plusieurs souris ont été comparés. Lorsque les données avaient des distributions non-paramétriques, un test Mann-Whitney-Wilcoxon (MWW) était utilisé. Pour l'évaluation des comportements myogéniques des CPM sur les hydrogels, des tests

appariés de Friedman suivis du test de comparaison multiples de Dunn ont été réalisés. Les calculs de puissance ont été effectués avec un intervalle de confiance de 95 %. Seules, les valeurs de  $p$  inférieures à 0,05 ( $p < 0,05$ ) ont été considérées comme statistiquement significatives. Les analyses statistiques et les graphiques ont été réalisés à l'aide du logiciel Prism 6.0. (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

### 3 RÉSULTATS

#### 3.1 L'activité myogénique des CPM est altérée en fonction de l'âge.

L'activité myogénique des CPM a été caractérisée sur des fibres intactes fraîchement isolées de souris C57Bl/6 mâles de 4 (adultes) et 24 mois (âgées) qui ont été mises en culture. À l'aide d'un immunomarquage des facteurs de transcription myogéniques Pax7 et MyoD, le nombre de CPM sur les fibres a été dénombré. Les résultats ont montré que le nombre total de CPM (tous marquages confondus) était significativement plus élevé sur les fibres fraîchement isolées chez les souris adultes ( $3,3 \pm 0,2$  cellules/fibre) par rapport aux fibres isolées de souris âgées ( $1,9 \pm 0,1$  cellules/fibre) (**Figure 3.1A**).



**Figure 3.1** L'activité myogénique est diminuée chez les CPM des fibres âgées.

(A) Histogramme du nombre total de CPM par fibre fraîchement isolée et cultivée (6 jours) de souris adultes et âgées (n=5 souris, groupe; 5-109 fibres/souris). (B, C) Histogramme des pourcentages de cellules satellites quiescentes (Pax7<sup>+</sup>MyoD<sup>-</sup>) et des CPM prolifératives (Pax7<sup>+</sup>MyoD<sup>+</sup>) et en voie de différenciation (Pax7<sup>-</sup>MyoD<sup>+</sup>) par fibre intacte (B) et endommagée (C). Les facteurs de transcription myogéniques Pax7 et MyoD ont été immunomarqués sur les fibres comme montré dans la microphotographie de droite et leur dénombrement a été fait sur toutes les profondeurs de champ et sur toute la longueur des fibres. L'histogramme montre que la proportion de cellules prolifératives Pax7<sup>+</sup>MyoD<sup>+</sup> est significativement plus faible chez la souris âgées par rapport aux souris adultes. \*\* $p < 0,01$  et \*\*\* $p < 0,0001$  versus groupe adulte. ††† $p < 0,001$  versus fibres intactes. Exprimées en moyenne  $\pm$  SEM.

Afin de définir l'état phénotypique des CPM, les fibres isolées issues de souris adultes et âgées ont été immunomarquées avec Pax7 et MyoD puis comptés selon que cet état soit quiescent ( $\text{Pax7}^+\text{MyoD}^-$ ), prolifératif ( $\text{Pax7}^+\text{MyoD}^+$ ) et engagé dans la différenciation ( $\text{Pax7}^-\text{MyoD}^+$ ). Les résultats ont indiqué que la proportion de cellules en état quiescent ( $\text{Pax7}^+\text{MyoD}^-$ ) était significativement plus élevée ( $95\pm 1\%$ ) sur les fibres isolées de tissus adultes par rapport à celles issues de muscles âgées ( $77\pm 4\%$ ). Toutefois, la proportion de cellules prolifératives était significativement plus élevée sur les fibres âgées ( $14\pm 3\%$  versus  $5\pm 1\%$ ). De même, la proportion de cellules en différenciation était également plus élevée sur les fibres issues de muscles de souris âgées ( $0\pm 0\%$  versus  $10\pm 3\%$ ) (**Figure 3.1B**).

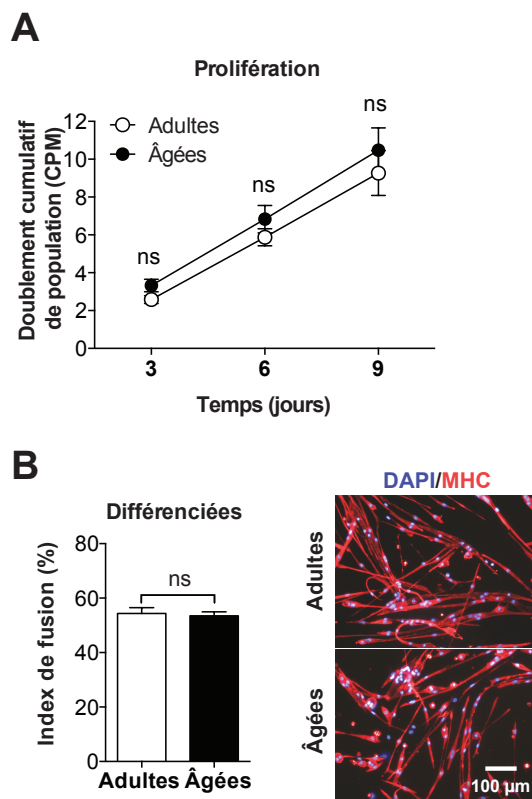
L'état phénotypique des CPM a été aussi caractérisé après 6 jours de culture sur des fibres endommagées provenant de souris adultes que âgées. Les données ont montré une diminution significative des CPM quiescentes ( $\text{Pax7}^+\text{MyoD}^-$ ) dans les fibres provenant de muscles âgées ( $8\pm 1\%$ ) par rapport à celles de muscles adultes ( $15\pm 2\%$ ). La proportion des cellules prolifératives ( $\text{Pax7}^+\text{MyoD}^+$ ) est significativement plus élevée dans les fibres adultes ( $59\pm 2\%$ ) par rapport aux fibres âgées ( $29\pm 2\%$ ). La proportion de CPM en voie de différenciation dans les fibres endommagées provenant de muscle âgées étaient toutefois plus élevée que celle de muscles adultes ( $55\pm 3\%$  versus  $33\pm 2\%$ , respectivement) (**Figure 3.1C**).

### 3.2 Potentiels de prolifération et de différenciation des CPM en fonction de l'âge.

Il a été récemment montré que le phénotype des CPM pouvait être influencé par la rigidité de son microenvironnement (TRENSZ, LUCIEN et al. 2015). Afin de vérifier si les phénotypes observés étaient dus à des changements du microenvironnement ou aux propriétés intrinsèques des CPM, les potentiels de prolifération et de différenciation CPM ont été investigués en fonction de l'âge des souris desquelles elles étaient issues. Dans une expérience de doublement de population cumulatif (CPD) les résultats ont montré qu'il n'y avait pas de différences significatives en fonction de l'âge (**Figure 3.2A**). Le potentiel de différenciation a été quantifié par un index de fusion. Les résultats ont permis de montrer que les CPM issues de souris adultes et âgées et différenciées dans les mêmes conditions *in vitro* n'ont pas montré de différences significatives ( $54\pm 2\%$  vs  $53\pm 1\%$ ) (**Figure 3.2B**). Nos



résultats montrent qu'une fois isolés et amplifiés les CPM adultes et âgées ne présentent aucune différence tant dans leur capacité de prolifération que de différenciation.



**Figure 3.2 Les potentiels intrinsèques de prolifération et de différenciation des CPM ne sont pas altérés avec l'âge.**

(A) Graphique montrant le doublement cumulatif de population de CPM primaires en culture (ou myoblastes) qui ont été isolées de souris adultes (n=3) et âgées (n=3). Les mesures de prolifération ont été réalisées sur trois passages pour chacune des lignées de CPM. (B) Graphique montrant l'index de fusion de CPM primaires de souris adultes (n=3) et âgées (n=3). L'index de fusion a été calculé à partir du décompte de cellules contenant plus de deux noyaux (DAPI) et qui étaient immunomarquées pour la chaîne lourde de la myosine (MHC). Images représentatives d'un immunomarquage utilisé pour établir l'index de fusion. Exprimées en moyenne  $\pm$  SEM.

### 3.3 L'augmentation de la rigidité du muscle squelettique est liée au vieillissement chez les souris.

Les CPM sont associées à la lame basale, une MEC spécialisée, son principal substrat. La MEC du muscle squelettique subit diverses modifications avec l'âge, dont une accumulation de collagène (TAKAHASHI, HOSHINO et al. 1995; GAO, KOSTROMINOVA et al. 2008; HINDLE, HORNING et al. 2009; RANDO 2010).

Afin de confirmer si cette augmentation est observable dans les souris C57Bl/6 adultes et âgées utilisées, des coupes de muscles de TA ont été colorées par un Trichrome de Masson, une coloration histologique permettant de mettre en évidence le collagène. L'observation des tissus montre une augmentation de la quantité de collagène (bleu) au pourtour des fibres et des faisceaux de fibres du muscle de souris âgées par rapport au muscle de souris adultes (**Figure 3.3A**).

L'augmentation dans le muscle squelettique âgé de son contenu en collagène pourrait impliquer des modifications mécaniques de la MEC et moduler le phénotype des cellules progénitrices qui s'y trouvent. Pour associer l'observation précédente du collagène avec les propriétés mécaniques du muscle squelettique, la rigidité de muscles provenant de souris adultes et âgées a été mesurée par AFM (**Figure 3.3B**). Les résultats obtenus de coupes longitudinales de TA et de Quad ont permis de montrer que le muscle âgé possédait une rigidité significativement plus importante (2.8 fois) que le muscle adulte et ce, tant dans le TA que dans le Quad, des muscles antagonistes importants au niveau des pattes postérieures.

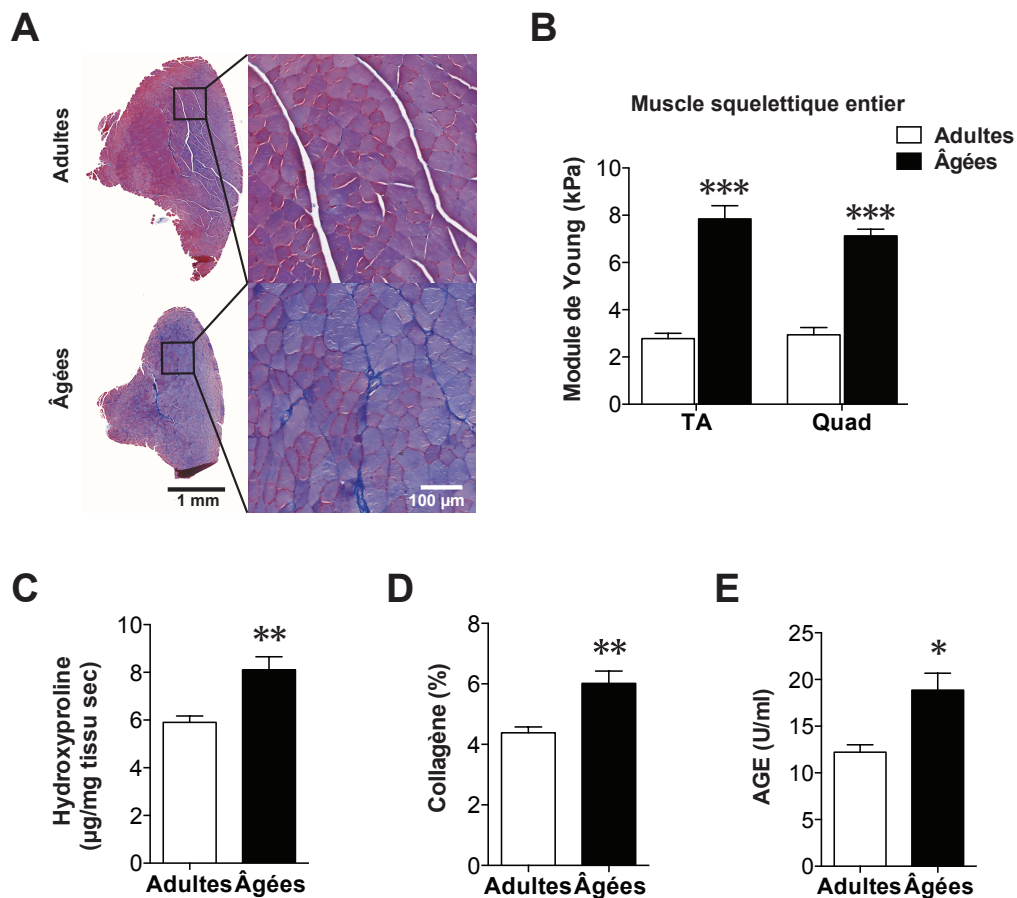
Ces observations ont été corroborées à l'aide d'un essai biochimique permettant de quantifier indirectement le collagène en dosant l'hydroxyproline totale (**Figure 3.3C**). Une courbe standard est préalablement établie sur laquelle les concentrations des inconnus (muscles) sont déterminées. Les résultats indiquent une augmentation significative de la quantité d'hydroxyproline dans le muscle de souris âgées par rapport aux muscles de souris adultes ( $8,1 \pm 0,6$  vs  $5,9 \pm 0,3$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  tissu sec, respectivement). La proportion de collagène dans les muscles est obtenue en convertissant les valeurs d'hydroxyproline selon la formule de Neuman et Logan (NEUMAN ET LOGAN 1950).

$$\text{Collagène (\%)} = \left[ \frac{\text{Hydroxyproline } (\mu\text{g}/\text{ml})}{\text{Tissu sec } (\mu\text{g}/\text{ml})} \right] \times 7,46 \times 100$$

Cette transformation des données a mis en évidence une augmentation significative du pourcentage du collagène dans les muscles de souris âgées ( $6,0 \pm 0,4\%$ ) par rapport aux souris adultes ( $4,4 \pm 0,2\%$ ) (**Figure 3.3D**), soit une augmentation d'environ 30% du contenu en collagène dans le muscle âgé.

Outre l'augmentation de la quantité de collagène, les propriétés mécaniques de la MEC peuvent également être modulée par son niveau de réticulation. La réticulation du collagène liée au vieillissement se fait principalement via un processus non enzymatique qui a comme produits finaux les *Advanced Glycation End-product* ou AGE. À l'aide d'un essai ELISA, le dosage des AGE a été effectué dans les Quad de souris adultes et âgées. Nos résultats montrent une augmentation significative de 65% dans le muscle squelettique âgé ( $18,9 \pm 1,8$  U/ml) par rapport au muscle adulte ( $12,2 \pm 0,8$  U/ml) (**Figure 3.3E**).

Ensemble, nos résultats montrent que la quantité de collagène et son niveau de réticulation pourraient expliquer en partie l'augmentation de la rigidité du muscle squelettique âgé.



**Figure 3.3** La rigidité du muscle squelettique est augmentée avec l'âge.

(A) Images représentatives des colorations au Trichrome de Masson de coupes transverses de TA des souris C57Bl/6 mâles adultes et âgées. Le collagène est coloré en bleu. (B) Graphique montrant la rigidité de muscles entiers qui a été mesurée sur des coupes longitudinales de 100 µm de TA et de Quad en fonction de l'âge des souris (adultes n=4; âgées n=7). Dix mesures ont été faites par coupe (3-5 coupes/souris). (C) Graphique montrant le dosage de l'hydroxyproline totale contenue dans les Quad de souris adultes (n=5) et âgées (n=5). (D) Graphique montrant le pourcentage du contenu en collagène des muscles de souris adultes et âgées. Ces valeurs ont été extrapolées des mesures d'hydroxyproline. (E) Mesures du contenu total des *Advanced Glycation End-products* (AGE) de Quad de souris adultes (n=5) et âgées (n=5). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  et \*\*\* $p < 0,0001$  versus groupe adulte. Exprimées en moyenne  $\pm$  SEM.

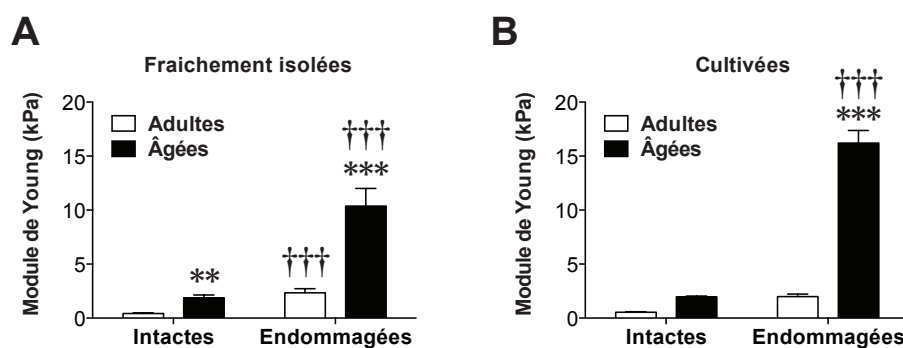
### 3.4 Les fibres endommagées de muscles âgés ont une grande rigidité

Puisque les CPM se trouvent sous une lame basale qui entoure la fibre musculaire, la rigidité de cette dernière fut également mesurée, mais cette fois-ci sur des fibres individualisées issues de muscles adultes et âgés. L'analyse de fibres vivantes fraîchement isolées et intactes a montré que la rigidité des fibres était significativement plus élevée chez celles issues de muscles de souris âgées par rapport à celles de souris adultes ( $1,9\pm 0,3$  vs  $0,4\pm 0,1$  kPa, respectivement) (**Figure 3.4A**).

Nos travaux précédents ont montré que la mort de la fibre en culture est caractérisée par sa contraction spontanée (réduction) et d'une augmentation concomitante de sa rigidité (ANDERSON, WOZNIAK et al. 2012; TRENZS, LUCIEN et al. 2015). Ces modifications du microenvironnement cause l'activation des cellules satellites et la prolifération des CPM par rapport à des fibres intactes cultivées durant la même période. Biologiquement, ce processus suggère qu'une augmentation de la rigidité lors de la mort de la fibre pourrait être un évènement favorisant l'initiation de la réparation.

Une analyse par microscopie à force atomique (AFM) a montré que les fibres intactes issues de muscles de souris âgées avaient une rigidité significativement plus élevée que celles issues de souris adultes ( $1,9\pm 0,3$  vs  $0,4\pm 0,1$  kPa, respectivement) (**Figure 3.4A**).

Compte tenu du phénomène de réduction des fibres, l'investigation de la modulation de la rigidité a été réalisée sur des fibres cultivées sur une période de 6 jours. Les résultats montrent que la rigidité des fibres issues de muscles de souris adultes et intactes est similaire. Toutefois, des variations significatives ont été observées entre les fibres endommagées fraîchement isolées ( $2,3\pm 0,4$  vs.  $10,4\pm 1,6$  kPa, respectivement) et cultivées ( $2,0\pm 0,2$  vs.  $16,2\pm 1,2$  kPa, respectivement) issues de muscles de souris adultes et âgées (**Figure 3.4A,B**).



**Figure 3.4 Une rigidité plus élevée des fibres endommagées issues de souris âgées altère l'activité des CPM.**

Graphiques montrant les valeurs de rigidité (kPa) de fibres musculaires intactes et endommagées de fibres fraîchement isolées (A) et cultivées durant 6 jours et qui ont été isolées de souris adultes (n=3) et âgées (n=5) (B). Une mesure par fibre a été recueillie sur 6-50 fibres. \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,0001$  versus homologue adulte. ††† $p < 0,001$  versus homologues intactes. Exprimées en moyenne  $\pm$  SEM.

### 3.5 Récapitulation *in vitro* de l'influence de la rigidité sur l'activité des CPM

#### 3.5.1 La rigidité influence le comportement des CPM cultivées

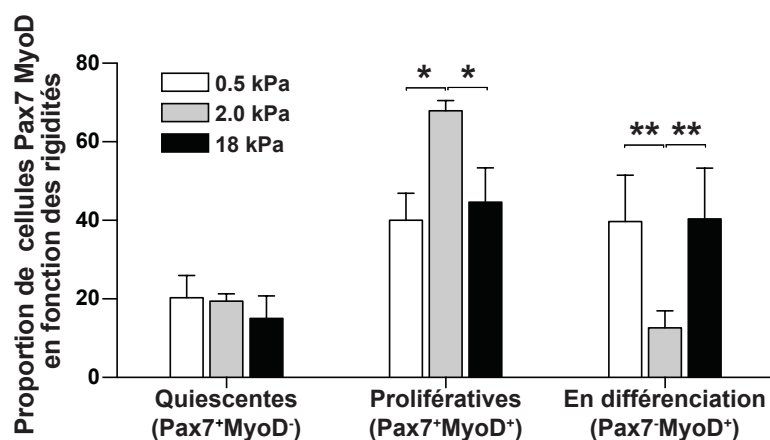
Les résultats de notre équipe et d'autres laboratoires ont permis de montrer que la rigidité du substrat pouvait influencer l'état phénotypique des CPM (ROWLEY ET MOONEY 2002; ENGLER, GRIFFIN et al. 2004; BOONEN, ROSARIA-CHAK et al. 2009; GILBERT, HAVENSTRITE et al. 2010; TRENSZ, LUCIEN et al. 2015).

Pour vérifier si les niveaux mesurés de rigidités dans les muscles et les fibres de souris adultes et âgées pouvaient contribuer à l'altération de l'activité des CPM, des hydrogels dont la rigidité correspondait à des fibres intactes fraîchement isolées adultes (0.5 kPa) et âgées (2 kPa), et à des fibres cultivées endommagées adultes (2 kPa) et âgées (18 kPa) ont été conçues. L'état phénotypique des CPM cultivées sur des matrices de différents substrats a été caractérisé par l'immunomarquage des facteurs de transcription myogéniques.

Les résultats ont montré que la proportion de cellules quiescentes (Pax7<sup>+</sup>MyoD<sup>-</sup>) est similaire entre les substrats de 0,5, 2,0 et 18 kPa. Par contre, la proportion de CPM prolifératives cultivées sur les hydrogels de 2 kPa est significativement plus élevée par rapport à celle de 0,5 kPa, ce qui va dans le même sens que l'augmentation de prolifération

observée sur les fibres fraîchement isolées intactes âgées versus adultes. La proportion de cellules prolifératives est également significativement plus faible pour les CPM cultivées sur un substrat plus rigide (18 kPa) (**Figure 3.5**), ce qui a corroboré les résultats obtenus précédemment où le pourcentage de CPM prolifératives étaient plus important sur les fibres adultes endommagées.

Enfin, le pourcentage de CPM en voie de différenciation est moins important sur les hydrogels à 2 kPa par rapport à ceux de 0,5 ou 18 kPa, suggérant que les CPM sont moins prolifératives et plus enclines à la différenciation sur les fibres endommagées âgées que sur les fibres endommagées adultes (augmentation de 3,3 fois,  $p = 0,0079$ ) (**Figure 3.5**).



**Figure 3.5 Le comportement des CPM a été reproduit en culture sur des matrices ayant des rigidités similaires aux fibres.**

Histogramme montrant la proportion de CPM quiescentes (Pax7<sup>+</sup>MyoD<sup>-</sup>), prolifératives (Pax7<sup>+</sup>MyoD<sup>+</sup>) et en voie de différenciation (Pax7<sup>+</sup>MyoD<sup>+</sup>) selon la rigidité des matrices fabriquées (0.5, 2.0 et 18 kPa). Des myoblastes primaires de souris adultes (n=5) ont été ensemencés sur chacune des matrices pendant 48h. Les cellules ont ensuite été fixées, colorées au DAPI puis, immunomarquées pour les protéines Pax7 et MyoD. Les cellules ont été comptées dans cinq champs aléatoires/puits et dans 4 puits/condition. \* $p < 0,05$  et \*\* $p < 0,01$ . Exprimées en moyenne  $\pm$  SEM.

### 3.5.2 Vérification de l'uniformité du revêtement de collagène et de l'adhérence des CPM en fonction de la rigidité des substrats

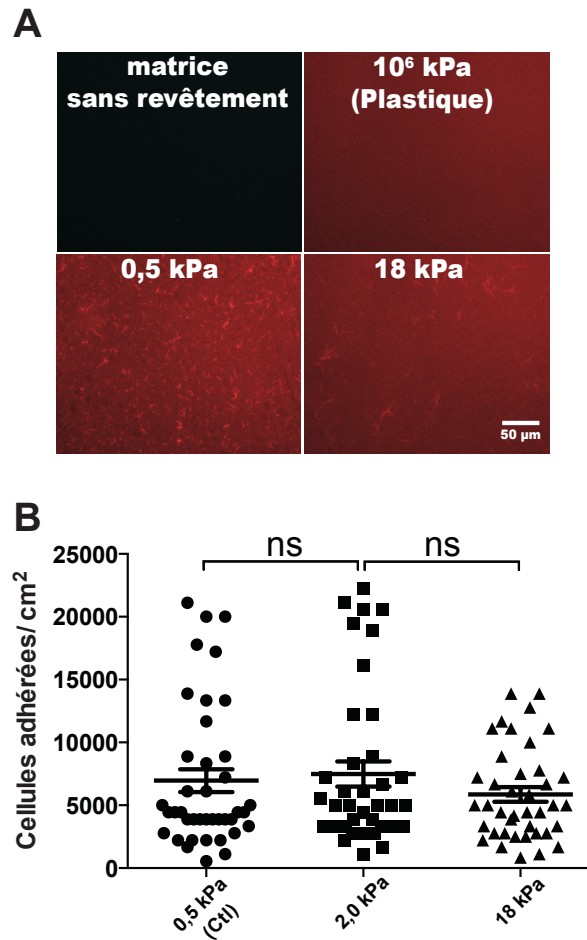
Pour s'assurer que les observations n'étaient pas dues par une variabilité du revêtement ou à une adhérence en fonction de la rigidité, deux contrôles ont été effectués.

Comme des études précédentes l'ont montré, le revêtement de collagène est constant bien que la rigidité des hydrogels varie (FLANAGAN, JU et al. 2002; KHATIWALA, PEYTON et al. 2006). En revêtant de collagène couplé à un fluorochrome, il a été possible de visualiser l'uniformité du revêtement de collagène, indépendamment de la rigidité des hydrogels. Ces observations en fluorescence sont compatibles avec celles décrites dans la littérature (ROWLANDS, GEORGE et al. 2008; TSE ET ENGLER 2011) (**Figure 3.6A**).

Comme le décompte des cellules est intimement lié à la mortalité des cellules et à leur adhérence, une expérience utilisant la mitomycine C, un bloqueur de la prolifération cellulaire, a été réalisées sur des CPM prétraitées etensemencées à une densité similaire (10 000 cellules/cm<sup>2</sup>). Après 2 jours, les CPM ont été fixées marquées au DAPI puis comptées. Les densités cellulaires obtenues ont été de 6960±906 cellules/cm<sup>2</sup> (0,5 kPa), 7488±995 cellules/cm<sup>2</sup> (2,0 kPa), 5862±579 cellules/cm<sup>2</sup> (18 kPa) et 6793±707 cellules/cm<sup>2</sup> pour 10<sup>6</sup> kPa (polystyrène), et sont non significativement différentes (**Figure 3.6B**).

Ensemble les résultats, suggèrent que les variations des états phénotypiques en fonction des rigidité ne sont pas due à des artéfacts expérimentaux (homogénéité du revêtement ou l'adhérence des cellules).





**Figure 3.6 La rigidité des hydrogels n'a pas influencé l'adhérence des CPM.**

(A) Micrographie en fluorescence illustrant l'uniformité du revêtement de collagène. Solution de collagène (0.1 mg/ml) couplé à un fluorochrome. (B) Variation relative de CPM/cm<sup>2</sup> après deux jours de culture de trois lignées de CPM adultes préalablement traitées à la mitomycine.

## 4 DISCUSSION

Le muscle squelettique est un assemblage complexe qui, outre ses compétences à soutenir et à mouvoir le squelette, a une importante capacité de régénération à la suite d'un dommage. Lors du vieillissement, le muscle subit divers changements, autant au niveau de ses composantes myogéniques que stromales. À ces changements se combine une altération de sa capacité à se régénérer. En plus des altérations de plusieurs voies de signalisations, dues à une modulation de plusieurs facteurs circulants, la matrice extracellulaire est également altérée. Il a été avancé que ces altérations de la matrice étaient liées à l'augmentation de la rigidité du muscle. Dans les dernières décennies, les facteurs biomécaniques ont été, eux aussi, considérés comme des éléments influençant le devenir des cellules. La rigidité est connue pour avoir une influence sur les cellules satellites. Ces cellules sont les principales responsables de la régénération de la fonction myogénique.

L'étude des cellules satellites est complexe vu la multitude des signaux auxquels elles sont soumises dans leur niche physiologique et du fait qu'elles s'activent au moment de leur isolement. Il est ainsi difficile d'isoler un facteur à la fois et d'observer son impact. Dans ce mémoire, nous avons mis en évidence des modifications quantitatives et qualitatives de la matrice extracellulaire. Nous avons associé ces altérations de la matrice avec l'augmentation de la rigidité en rapport à l'âge. Par ailleurs, nous soulignons les similitudes entre les capacités de prolifération et de différenciation des myoblastes isolés des souris adultes et âgées. Enfin, nous avons observé l'impact de la rigidité sur les cellules satellites autant *ex vivo* qu'*in vitro*, qui pourrait être une cause plausible de la diminution du potentiel de régénération observé dans le muscle squelettique âgé.

### 4.1 Activité myogénique des CPM.

En premier lieu, voici une revue des observations des certains chercheurs qui ont montré des variations du nombre de cellules satellites avec l'âge (GIBSON ET SCHULTZ 1983; RENAULT, THORNELL et al. 2002; CONBOY, CONBOY et al. 2003; SAJKO, KUBINOVA et al. 2004; BRACK, BILDSOE et al. 2005; SHEFER, VAN DE MARK et al. 2006). Tout d'abord, les résultats de l'équipe de Schultz semblent aller à l'encontre du paradigme établi sur les capacités myogéniques du muscle vieillissant. Par histologie, cette équipe a évalué les proportions de noyaux des myofibres sur les noyaux non musculaires ( $p_{m/n}$ ). En

microscopie électronique, ils ont calculé la proportion de cellules satellites sur le total des noyaux des myofibres ( $p_{s/m}$ ). Cette proportion de cellules satellites ( $p_s$ ) a été obtenue en multipliant les deux dernières valeurs. Une approximation du nombre absolu de cellules satellites totales des muscles a ensuite été calculée par une multiplication avec l'approximation du nombre total de noyaux du muscle ( $ADN_{tot} / 6,2$  pg d'ADN par noyau). L'équipe de Schultz a ainsi montré une augmentation du nombre absolu de cellules satellites dans le *soleus* de rats et une légère diminution dans l'EDL avec l'âge. Cette observation est surprenante si l'on admet une diminution des capacités de régénération du muscle en fonction du vieillissement. Dans ce calcul particulier, il faut considérer la possibilité que pour plusieurs proportions, certaines erreurs ont pu s'additionner. Cependant, si l'on omet cette possibilité, les résultats obtenus par l'équipe Schultz supportent la thèse que l'altération des capacités du muscle avec l'âge serait plutôt causée par l'environnement des cellules (GIBSON ET SCHULTZ 1983).

Subséquentement, deux équipes ayant travaillé sur des muscles humains ont montré une diminution de la proportion de cellules satellites par rapport au nombre de noyaux des myofibres (ou myonuclei). L'équipe de Mouly *et al.* (RENAULT, THORNELL et al. 2002), après avoir montré que la longueur des télomères demeurerait inchangée avec l'âge, a réalisé des marquages de NCAM de coupe de muscles (masséter et biceps). Ils ont observé que le nombre de cellules satellites par fibre demeurerait inchangé, mais que la proportion de cellules satellites sur le nombre de myonuclei diminuait avec l'âge. Leurs résultats suggèrent que la baisse du potentiel de régénération dans le muscle pourrait être causée par un faible taux de renouvellement (RENAULT, THORNELL et al. 2002). De son côté, l'équipe de Erzen *et al.* (SAJKO, KUBINOVA et al. 2004) a aussi fait la démonstration d'une diminution de la réserve de cellules satellites dans le *vastus lateralis*. Ils ont marqué les cellules satellites avec un anticorps contre la M-cadhérine et la LB avec un anticorps contre la laminine, pour bien distinguer les cellules. Dans leurs recherches, les proportions de cellules satellites en fonction de la longueur de la fibre, et du nombre de myonuclei, diminuent avec l'âge. Compte tenu de certaines expériences précédentes, qui semblent sous-entendre que les cellules âgées peuvent retrouver leurs capacités prolifératives et régénératrices, il suggère qu'un dysfonctionnement des mécanismes de division asymétrique supporterait leurs observations (SAJKO, KUBINOVA et al. 2004).

Les résultats de la présente recherche sur le nombre de cellules satellites par fibres sont plus aisément comparables à ceux de l'équipe de Yablonka-Reuveni *et al.* (SHEFER, VAN DE MARK et al. 2006) car ils ont également utilisé Pax7 pour effectuer le compte des cellules satellites par myofibre. Ainsi, pour des groupes d'âge comparables l'équipe Yablonka-Reuveni a obtenu des moyennes de 9 satellites/myofibre chez les adultes et de 4 satellites/myofibre chez les spécimens âgés. Comparativement, notre groupe qui a obtenu des moyennes de 3,3 chez les adultes et de 1,9 chez les spécimens âgés (**figure 3.1A**). L'écart entre ces résultats s'explique en partie par les différences d'isolement et de marquage. De notre côté, nous avons inclus dans notre dénombrement toutes les cellules qui avaient un marquage positif pour Pax7, MyoD ou pour les deux, nos comptes devraient donc être supérieurs à ceux de l'équipe Yablonka-Reuveni. Cependant, dans cette étude, nous avons effectué des comptes sur un plus grand nombre de souris et sur plus de fibres par souris. Il faut aussi considérer que notre période d'isolement des fibres a été plus longue que la leur, ce qui pourrait expliquer les plus faibles moyennes obtenues dans notre laboratoire. Le rapport de ces moyennes reste toutefois comparable. Nous avons constaté 1,74 fois plus de cellules satellites/fibre pour les souris adultes alors que l'équipe Yablonka-Reuveni en rapporte 2,25 fois plus. Ainsi, nos résultats vont dans le sens de la littérature en ce qui a trait à la diminution du nombre de cellules satellites associées aux fibres en fonction de l'âge (GIBSON ET SCHULTZ 1983; RENAULT, THORNELL et al. 2002; SAJKO, KUBINOVA et al. 2004). Aussi, notre équipe a observé un plus grand nombre de fibres issues de tissus âgés, sur lesquelles il n'y avait pas de cellules marquées. Suite au maintien en culture sur un revêtement de matrigel durant deux semaines, leur équipe fait aussi valoir qu'il n'y avait pas de perte de potentiel myogénique chez les cellules issues de tissus âgés. Pour expliquer la diminution du réservoir de cellules satellites observée en lien avec l'âge, ils terminent en suggérant un modèle basé sur un problème d'auto-renouvellement (SHEFER, VAN DE MARK et al. 2006).

En second lieu, nous avons voulu vérifier le comportement de ces cellules au niveau de la prolifération et de la différenciation en utilisant le modèle de culture sur fibre en suspension (*ex vivo*). Nous avons d'abord procédé à un double marquage Pax7 et MyoD sur des fibres intactes fraîchement isolées de tissus adultes (0.4 kPa) et de tissus âgés (1.9 kPa) (**figure 3.4**). Nous avons observé une plus grande proportion de cellules en quiescence

(Pax7<sup>+</sup>/MyoD<sup>-</sup>) sur les fibres adultes. Puis, sur les fibres âgées, les proportions de cellules prolifératives (Pax7<sup>+</sup>/MyoD<sup>+</sup>) et en voie de différenciation (Pax7<sup>-</sup>/MyoD<sup>+</sup>) étaient plus grandes (**figure 3.1B**). Malheureusement, aucune valeur de comparaison n'a été trouvée dans la littérature. Ces proportions s'expliquent tout de même en partie par la rigidité, mais aussi par tous les facteurs biochimiques présents dans les muscles jusqu'au moment de l'isolement (p.ex. statut des signalisations Notch, Wnt, quantités des facteurs de croissance, interactions avec la matrice). La rigidité a sans doute un rôle à jouer, entre autres sur l'état prolifératif puisqu'il est connu que dans le tissu âgé, la signalisation Notch est diminuée et la quantité d'IGF-1 est plus faible (CARLSON, HSU et al. 2008; MAGGIO, DE VITA et al. 2013).

Par la suite, des fibres ont été mises en culture durant six jours et les fibres (adultes et âgées) endommagées ont été marquées. Ici, il faut considérer l'effet du milieu de culture qui est supplémenté en sérum et en bFGF (voir section 4.6 M&M). Aussi, la prolifération des cellules provoque un bourgeonnement, ce qui déchire la LB et perturbent grandement, les interactions entre les cellules et la MEC. De plus, les fibres réduites (endommagées) sont des fibres mortes, ainsi la signalisation Notch et autres molécules de jonction cellulaire (p.ex. les cadhérines) doivent être non fonctionnelles. La rigidité devient donc un facteur potentiellement plus important. Dans cette situation nous avons obtenu une proportion plus grande de cellules prolifératives sur les fibres adultes (2.0 kPa) ainsi qu'une proportion plus élevée de cellules en voie de différenciation sur les fibres âgées (16.2 kPa) (**figure 3.4**). Ce résultat suggère que l'augmentation de la rigidité observée sur les fibres âgées endommagées réduirait la capacité de prolifération des CPM et pourrait nuire au potentiel régénératif dans le muscle squelettique âgé.

Ces résultats sont en accord avec les observations précédentes de notre laboratoire indiquant une augmentation de la prolifération des CPM sur une rigidité de 2 kPa (TRENZ, LUCIEN et al. 2015).

#### 4.1.1 Potentiel de prolifération et de différenciation des CPM

Pour expliquer la diminution du potentiel régénératif constaté dans le muscle âgé, la majorité de la littérature pointe vers les modifications de l'environnement. Que ce soit par la diminution de la signalisation Notch (CONBOY, CONBOY et al. 2003), les altérations de la voie Wnt (SCIME, DESROSIERS et al. 2010) ou la diminution des taux de certains facteurs de

croissance comme l'IGF-1 (MAGGIO, DE VITA et al. 2013). L'équipe de Yablonka-Reuveni *et al.* (SHEFER, VAN DE MARK et al. 2006) a montré que les potentiels de prolifération et de différenciation entre les CPM adultes et âgées ne présentaient pas de différences importantes. Cela supporte la thèse selon laquelle les modifications extrinsèques aux cellules pourraient expliquer la déficience de régénération du muscle âgé. Leur équipe a d'abord effectué des isolements de fibres d'EDL et les a placées en culture pendant deux semaines. Des doubles marquages (Pax7/MyoD) pour la prolifération et pour la différenciation (DAPI/MHC) étaient ensuite pratiqués, après une semaine, puis après deux semaines. Cette technique leur a permis de conclure que les capacités des CPM âgées n'étaient pas altérées, autant pour la prolifération que pour la différenciation. Les quantités de cellules âgées étant inférieures, ils ont voulu s'assurer que ce phénomène s'expliquait par une observation précédente montrant un nombre plus faible de cellules satellites sur les fibres âgées. L'équipe a donc répété l'expérience d'ensemencement des CPM aux mêmes concentrations, suivies par des marquages à intervalles, durant deux semaines. Ils en ont conclu que les cellules âgées ont une phase de retardement de 24 heures au début de leur prolifération sans que cela n'affecte leur capacité de différenciation (SHEFER, VAN DE MARK et al. 2006). Les résultats fournis lors de la présente étude n'ont pas été obtenus à partir de cellules fraîchement isolées. Puis, pour vérifier la capacité de prolifération, des comptages de trois lignées (cultures primaires) adultes et âgées ont été effectués sans apparente différence. Cela semble aller dans le même sens que les conclusions de l'équipe de Yablonka-Reuveni. Pour la différenciation, nous avons procédé en calculant les index de fusion suite à la différenciation des mêmes lignées et n'avons constaté aucune différence.

Une diminution de la protection contre les antioxydants a déjà été montrée dans le muscle âgé, ainsi que l'expression plus élevée de protéines de régulation de l'apoptose dans les cellules satellites âgées (JANG, SINHA et al. 2011). Il est donc possible que des modifications intrinsèques soient présentes dans les cellules satellites âgées mais, nos résultats renforcent plutôt la théorie d'une altération du microenvironnement pour expliquer le déficit régénératif du muscle âgé. D'autres études vont aussi en ce sens. L'équipe de Rudnicki *et al.* (SCIME, DESROSIERS et al. 2010) a montré dans le muscle squelettique de souris, qu'il y a une différence d'expression de plusieurs gènes de la MEC entre les souris jeunes (3 mois) et âgées (24 mois). L'équipe de Rudnicki, a aussi mis en évidence des

différences d'expressions pour plusieurs protéines d'adhérence et de facteurs ayant un impact sur le cycle cellulaire, la prolifération et la différenciation des cellules satellites (SCIME, DESROSIERS et al. 2010). Leurs expériences de qPCR ont ainsi permis de souligner l'importance de certains facteurs de croissance pour le maintien des fonctions des cellules satellites lors du vieillissement. Puis, par une expérience de parabiose consistant à fusionner deux individus pour qu'ils partagent un même environnement systémique, il a été montré que les capacités régénératives du muscle de souris âgées pouvaient être rétablies lorsqu'exposées à un environnement systémique de jeunes souris (CONBOY ET RANDO 2012).

#### **4.2 Le collagène et les *Advanced Glycation End-products* (AGE) augmentent dans le muscle des souris âgées.**

La composition de la matrice extracellulaire est cruciale pour son bon fonctionnement, tant pour ses rôles biologiques que mécaniques (HAUSCHKA ET KONIGSBERG 1966; KAARIANEN, JARVINEN et al. 2000; MICHELE ET CAMPBELL 2003; KJAER 2004). Le collagène représente une des composantes principales de la matrice extracellulaire et plusieurs méthodes existent pour mettre ceci en évidence dans les tissus.

La fibrose est une caractéristique qui a été associée au vieillissement et à d'autres pathologies, comme la dystrophie (GOSSELIN, ADAMS et al. 1998; BAILEY 2001; MEREGALLI, FARINI et al. 2014). L'augmentation du collagène a déjà été montrée dans plusieurs muscles de rongeurs (ALNAQEEB, AL ZAID et al. 1984; MORISSETTE, STRICKER et al. 2009; RAMASWAMY, PALMER et al. 2011). Dans la présente étude, cette augmentation a été imagée par une coloration de trichrome de Masson. On a ainsi constaté une augmentation de la quantité de collagène autour des fibres (**figure 3.3**) sur des TA de souris C57Bl/6, telle que relevée par l'équipe de Rando *et al.* ; par un trichrome de Gomori (BRACK, CONBOY et al. 2007). Il y a donc une apparente augmentation du collagène de l'endomysium dans le muscle de souris, comme observé chez le rat (ALNAQEEB, AL ZAID et al. 1984).

L'hydroxyproline est retrouvé en grande quantité dans le collagène et peut être quantifier pour déterminer les niveaux de collagène dans les tissus (SHIGEMURA, KUBOMURA et al. 2014). Il a été montré, chez la souris, que la quantité d'hydroxyproline était 2 fois plus élevée dans le muscle âgé et la quantité d'AGE était 3 fois plus élevée

(WOOD, KAYUPOV et al. 2014). Nos résultats, bien que montrant une augmentation significative de l'hydroxyproline, soulignent aussi une augmentation plus modeste d'environ 40% lié à l'âge. Cette différence pourrait être explicable par l'âge des spécimens, les types de muscles utilisés et à leur traitement. En effet, nos spécimens adultes utilisés dans cette étude avaient entre 3 et 6 mois et les souris âgées, de 24 à 26 mois, donc tous plus jeunes que les souris de l'étude de l'équipe de Brooks (WOOD, KAYUPOV et al. 2014). Lors de la présente étude, les quadriceps ont été évalués (non le TA) et les tissus n'ont pas été décongelés avant lyophilisation. Notamment, la technique utilisée ici impliquait une hydrolyse acide de 4 heures seulement, en comparaison à toute la nuit pour l'équipe de Brooks. Convertis en collagène, nos résultats ( $4,4\% \pm 0,2$  de collagène dans le quadriceps) sont du même ordre de grandeur que les muscles abdominaux de rats évalués par Neuman *et al.*, soit 5,77% (NEUMAN ET LOGAN 1950).

Les AGE sont considérés comme des marqueurs du vieillissement et résultent de réactions non enzymatiques impliquant les protéines et les sucres (NASS, VOGEL et al. 2010). Ils seraient responsables de l'augmentation de perturbations des mécanismes intracellulaires et augmenteraient la probabilité de développement de maladies chroniques (HEIN ET FRANKE 2002; SNOW, FUGERE et al. 2007; SEMBA, NICKLETT et al. 2010). Une fois de plus, nos résultats diffèrent et montrent une augmentation plus faible que dans l'étude de Wood *et al.* (WOOD, KAYUPOV et al. 2014). Toujours dans les quadriceps, nos résultats montrent une augmentation des AGE de 65% chez les spécimens âgés. Pourtant, les différences entre les résultats de l'équipe de Brooks et ceux de la présente étude s'expliquent seulement par les différences générées entre les manipulateurs et par les muscles utilisés, car la méthode était la même.

Ces résultats pris ensemble montrent des modifications en quantité et en qualité de la MEC. Ceci est en accord avec les résultats précédents de notre laboratoire où une augmentation de l'expression, notamment de gènes de la MEC avait été observée chez les souris âgées (SCIME, DESROSIERS et al. 2010). De façon plus générale, nos résultats sont aussi en accord avec la littérature concernant l'augmentation du collagène et des AGE, dans le muscle squelettique, en fonction de l'âge (GOSSELIN, ADAMS et al. 1998; WOOD, KAYUPOV et al. 2014).



### 4.3 La rigidité augmente dans le muscle squelettique et les fibres de muscles âgés

Plusieurs chercheurs ont déjà montré l'augmentation de la rigidité du muscle avec l'âge (ALNAQEEB, AL ZAID et al. 1984; GOSSELIN, ADAMS et al. 1998; GAO, KOSTROMINOVA et al. 2008). Plus particulièrement, Gao *et al.* ont montré une augmentation de la rigidité de l'épimysium. Alnaqeeb *et al.*, ont quant à eux montré qu'à mesure que l'âge augmente, il y a une diminution de la tension active. Ainsi, la corrélation a été faite entre l'augmentation de collagène et l'augmentation de la rigidité du muscle (ALNAQEEB, AL ZAID et al. 1984). Quelques années plus tard, c'est l'augmentation de la réticulation du collagène qui a été reliée au phénomène (GOSSELIN, ADAMS et al. 1998). Finalement, l'équipe de Trappe a suggéré que les AGE seraient en grande partie responsables de l'augmentation de la rigidité de la MEC, ainsi que de la détérioration des propriétés mécaniques du muscle (HAUS, CARRITHERS et al. 2007).

L'AFM a été utilisée pour vérifier s'il est possible d'établir une relation entre les modifications de la matrice observées et la rigidité dans notre modèle. On l'a aussi utilisée pour identifier des rigidités représentatives du muscle squelettique chez la souris. L'équipe de Discher *et al.* (ENGLER, RICHERT et al. 2004) a réalisé des mesures sur des tranches de EDL de souris adultes et dystrophiques (souris mdx) et a obtenu les valeurs suivantes : 12 kPa pour les souris adultes et 18 kPa pour les souris mdx. Les valeurs obtenues par notre laboratoire sont inférieures à celle de Engler, autant dans les TA (2.8 kPa adultes versus 7.8 kPa âgés) que dans les Quad (2.9 kPa adultes versus 7.8 kPa âgés). On a tout de même observé une augmentation significative de la rigidité sur des tranches de tissu de la même épaisseur que celles utilisées par Engler. Il est à noter ici que nos mesures ont été réalisées sur des TA, comme sur des Quad, et que nos tissus étaient immergés dans un milieu CO<sub>2</sub> indépendant, contrairement à la méthodologie utilisée par Engler. Aussi, le cantilever utilisé pour la présente recherche était différent de celui utilisé par Engler par son bout arrondi et par sa constante de ressort (k) inférieure. Le modèle utilisé était le même (modèle de Hertz pour indentateur pyramidal). Par contre, le logiciel de conversion des courbes F/D en module de Young (voir section 2.9) est, dans notre cas, un logiciel maison produit par l'équipe du Pr Michel Grandbois du département de Pharmacologie de l'Université de Sherbrooke. Comme l'équipe de Discher l'a souligné précédemment, les caractéristiques mécaniques du muscle sont hétérogènes et souvent anisotropiques. Considérant la

configuration du module d'AFM (**figure 2.2 et 2.3**), il est évident que comme nos coupes étaient longitudinales, la pointe de notre cantilever pouvait parfois être positionnée sur les fibres et parfois à l'intérieur de celles-ci. Cela dit, malgré ces différences de résultat, l'AFM reste un des moyens les plus sensibles pour évaluer la rigidité à l'échelle de la cellule (ENGLER, RICHERT et al. 2004). Bien que les valeurs absolues soient différentes, le rapport entre nos valeurs (muscle âgé/muscle adulte) reste réel et peut se comparer au rapport des valeurs obtenus par Engler (mdx/C57). Malheureusement, aucune valeur d'AFM comparative entre le tissu adulte et âgé n'existe dans la littérature.

Pour la rigidité des fibres de tissus adultes, les études produisent des valeurs de rigidité très différentes, allant de 8 kPa (CANATO, DAL MASCHIO et al. 2010) jusqu'à 61 kPa (DEFRANCHI, BONACCURSO et al. 2005). Comme spécifié plus haut, ces différences s'expliquent en partie par les différences de cantilever (p. ex. constante de ressort, pointe), par des différences d'amplitudes d'indentation et des différences établies par la variété des logiciels de conversion de courbes F/D utilisés. Or, les variances dans la préparation des fibres comme le temps de digestion enzymatique à l'isolement, le milieu de maintien lors de l'évaluation à l'AFM ainsi que dans la méthode de fixation des fibres dans le pétri, ont aussi leur importance. Dans une autre étude, la méthode d'isolement utilisée est comparable à la nôtre et le modèle est le même. Toutefois, le muscle duquel on a isolé les fibres est différent, tout comme la méthode pour fixer ces fibres, malgré cela, elle a produit des données comparables. L'équipe de Morano (MARG, HAASE et al. 2010) obtient 0.35 kPa pour des fibres de souris adultes alors que nous avons mesuré 0.43 kPa et ce, même si la pointe et la constante de ressort des cantilevers utilisés sont différentes. Il est à considérer que lors de la présente étude, un nombre plus élevé de fibres a été quantifié que lors des recherches de l'équipe de Morano. Pour Marg, l'objectif était de comprendre la fonction et de localiser la protéine AHNAK (protéine d'échafaudage), une protéine reliée au processus de réparation de la membrane pour divers types cellulaires (MARG, HAASE et al. 2010). Donc, malgré la quantité de facteurs pouvant affecter les résultats, il est possible d'obtenir des valeurs similaires aux nôtres dans la littérature. Encore une fois, aucune rigidité de fibres de souris âgées, mesurées en AFM, n'a été trouvée dans la littérature. Cependant, notre équipe a pu être observée une rigidité environ quatre fois supérieure dans les fibres âgées comparées aux fibres adultes.

En outre, nous avons validé une observation de notre laboratoire concernant les fibres endommagées (ou mortes). En effet, les fibres adultes réduites étaient environ quatre fois plus rigides que les fibres intactes. De plus, le fait qu'elles aient été cultivées durant six jours ne semble pas avoir eu d'effet sur leur rigidité initiale et sur le rapport entre la rigidité des fibres intactes et endommagées. Par contre, pour les fibres âgées ce fut différent. Les fibres intactes évaluées le jour même ou après six jours de culture avaient la même rigidité. Cependant, celle-ci augmentait de cinq à huit fois lorsque les fibres étaient endommagées. Ce résultat est lié au fait que les fibres réduites au sixième jour de culture n'étaient pas toutes réduites au moment de leur mise en culture. Les mesures, au jour de mise en culture et au sixième jour de culture, n'ont pas été effectuées sur les mêmes fibres. Aussi, il est connu que l'augmentation des AGE, observée dans le muscle squelettique âgé, provoque une augmentation de la résistance à la digestion par la collagénase (HEIN ET FRANKE 2002). Ainsi, une plus grande quantité de MEC et/ou de réticulation du collagène de la MEC peut, par conséquent, être envisagée comme cause de cette augmentation de la rigidité observée sur les fibres âgées et endommagées.

Comme observé dans plusieurs autres recherches, les résultats de la présente étude montrent un lien entre l'augmentation de collagène de l'endomysium et l'augmentation de la rigidité du tissu en fonction de l'âge (ALNAQEEB, AL ZAID et al. 1984; GOSSELIN, ADAMS et al. 1998; GAO, KOSTROMINOVA et al. 2008).

#### **4.4 Impact de la rigidité sur la prolifération et la différenciation**

En troisième lieu, plusieurs équipes ont déjà montré que la rigidité du substrat influence l'activité myogénique des CPM *in vitro* (BOONTHEEKUL, HILL et al. 2007). Notre équipe a récemment observé que la prolifération des CPM est stimulée lorsque le substrat de culture a une rigidité de 2 kPa, et ce, à l'aide d'un marquage de KI-67, une protéine nucléaire associée à la prolifération (TRENZ, LUCIEN et al. 2015). C'est l'équipe de Mooney qui a été la première à montrer, avec des gels d'alginate, l'influence de la rigidité sur la lignée de myoblastes C2C12 (ROWLEY ET MOONEY 2002). Par décompte cellulaire, ils ont montré que la prolifération était inhibée sur des gels plus mous, et ce, peu importe la densité du revêtement. Ils ont aussi mis en évidence que la prolifération était augmentée et qu'elle était dépendante de la densité du revêtement sur des gels rigides. Ils se sont intéressés à la différenciation en mesurant l'activité de l'enzyme créatine kinase du muscle

(MCK). Ainsi, ils ont constaté que pour favoriser la différenciation, il devait y avoir une forte densité de protéines de revêtement et une plus grande rigidité. Rowley suggérait, pour la première fois avec des cellules myogéniques, que l'organisation chimique et la densité du revêtement étaient deux facteurs importants pour orienter les fonctions cellulaires sur les gels d'alginate (ROWLEY ET MOONEY 2002). Une autre équipe (ENGLER, GRIFFIN et al. 2004), utilisant des hydrogels de PA (1, 8, 11, 17 kPa) avec revêtement de collagène, a par la suite observé que la fusion des membranes de C2C12 et de CPM primaire de souris était indépendante de la rigidité. Cette équipe-ci a aussi observé que les forces d'adhésion, l'étalement, l'élongation et l'alignement coopératif étaient dépendants de la rigidité. Les rigidités de 8 et de 11 kPa optimisaient l'organisation en stries de l'actine et de la myosine pour les CPM, états qu'ils retrouvaient lorsqu'ils cultivaient les CPM sur une couche de C2C12. L'équipe de Discher conclut en soulignant les implications de leurs découvertes dans un contexte d'utilisation des cellules souches *in vivo* dans des muscles malades ou endommagés dans lesquels les propriétés mécaniques pouvaient être altérées (ENGLER, GRIFFIN et al. 2004). Une importante découverte a aussi récemment été faite par l'équipe de Blau *et al.* (GILBERT, HAVENSTRITE et al. 2010). Ils ont montré, sur des hydrogels de PEG de 12 kPa, que des CPM primaires de souris survivaient mieux que sur le plastique de culture standard. De plus, après une semaine de culture, les chercheurs injectaient les cellules dans les TA de souris. Quatre semaines suivant l'injection ils observaient, une reprise de greffe supérieure aux cellules cultivées sur le plastique ou sur des rigidités de 2 ou 42 kPa (GILBERT, HAVENSTRITE et al. 2010). Cette étude souligne cette fois l'importance de la rigidité sur l'amplification des CPM pour le développement de soins concernant les pathologies impliquant des pertes musculaires.

Par ailleurs, l'équipe de Post *et al.* a observé, par des essais au BrdU, une influence de la rigidité sur la prolifération et sur la différenciation par double marquage (MyoD et MHC) durant plusieurs jours (BOONEN, ROSARIA-CHAK et al. 2009). La rigidité de leurs hydrogels de PA a été évaluée de manière macroscopique (3, 14, 21, 48, 80 kPa) et ils ont utilisé plusieurs types de revêtement (matrigel, entactine-collagène-laminine, collagène IV et laminine-poly-D-lysine). Ils ont obtenu une prolifération optimale sur une rigidité de 21 kPa, mais plus encore, ils ont constaté que la prolifération n'était influencée que par la rigidité. Comme nos rigidités n'étaient pas les mêmes, et que notre méthode d'évaluation

est à l'échelle microscopique, il est difficile de comparer nos résultats à ceux de Boonen à cet effet. Toutefois, la rigidité optimale de 2 kPa que nous avons obtenu dans notre expérience de récapitulation *in vitro* n'est pas notre rigidité la plus élevée, comme pour celle obtenue par Post et son équipe (**figure 3.5**). Comme l'équipe de Discher, Boonen conclut que la fusion est indépendante de la rigidité. Par contre, en ce qui a trait à la différenciation, l'équipe de Post a noté que la maturation est dépendante du type de revêtement et que la maturation avec contraction des myotubes dépend aussi de la rigidité (BOONEN, ROSARIA-CHAK et al. 2009). Ceci va dans le même sens que les conclusions de l'équipe de Mooney (ROWLEY ET MOONEY 2002). Dans la présente étude, un revêtement de collagène a été utilisé, nous montrons dans notre cas que l'engagement vers la différenciation est favorisé sur les rigidités de 0,5 et 18 kPa (**figure 3.5**). Comme susmentionné, il est important de savoir qu'entre notre étude et celle de Boonen, la méthode d'isolement n'était pas la même. Dans le cas des recherches menées par Boonen, les CPM étaient étudiés au premier passage et donc comportaient inévitablement une contamination par d'autres types cellulaires. Ces autres types cellulaires ont pu avoir des effets indirects sur les cellules utilisées. Pour la présente recherche, nous utilisons les cellules à plus haut passage (entre 6 et 11), nous disposons donc de populations pratiquement pures.

Nos résultats vont donc dans le sens de la littérature de façon générale, pour indiquer que la rigidité a bien un effet sur la prolifération et la différenciation de CPM

#### **4.5 Récapitulation *in vitro* de l'influence de la rigidité sur l'activité myogénique des CPM**

Finalement, selon Engler, la concentration protéique du revêtement est une condition importante en culture cellulaire (ENGLER, BACAKOVA et al. 2004). Nous avons donc voulu nous assurer de la qualité de nos revêtements sur les hydrogels de PA que nous avons conçu. La technique de liaison des protéines aux hydrogels utilisée par Rowlands *et al.* diffère de celle utilisée lors de la présente recherche. L'équipe de Cooper-White *et al.* (ROWLANDS, GEORGE et al. 2008) avait des gels de rigidités différentes des nôtres (0.7, 10, 30, 80 kPa) et utilisait le N-succinimidyl-6-[4-azido-2-nitrophenylamino] hexanoate (SANPAH), un agent réticulant différent du nôtre. Leur équipe a, comme la nôtre, montré l'uniformité de leurs revêtements par fluorescence (ROWLANDS, GEORGE et al. 2008). Une autre équipe, ayant utilisé le SANPAH comme agent réticulant, a effectué une analyse

d'intensité de la fluorescence (KHATIWALA, PEYTON et al. 2006). Nos images en microscopie à fluorescence (**figure 3.6**) montrent comme pour les études précédentes l'uniformité de la technique que nous avons utilisée. Cependant, comme nous n'avons pas fait d'analyse protéique comme d'autres chercheurs (FLANAGAN, JU et al. 2002), nous avons eu à confirmer doublement l'efficacité de notre méthode par comparaison d'adhérence de nos cellules sur nos diverses rigidités (**figure 3.6**). C'est en bloquant la prolifération des cellules et en les plaçant en culture que nous avons pu nous assurer de l'uniformité de l'adhérence.

Ces résultats permettent de confirmer que nous avons réalisé de façon efficace nos revêtements, comme l'équipe de Assoian *et al.* (CRETU, CASTAGNINO et al. 2010).

## 5 CONCLUSION ET PERSPECTIVES

En conclusion, ce mémoire supporte l'hypothèse que des modifications de la MEC ont cours dans le muscle squelettique vieillissant. Il établit une relation entre le vieillissement et l'augmentation de la rigidité du muscle.

Nous avons établi pour la première fois une comparaison des rigidités de muscle squelettique de souris adultes et âgées effectuées en AFM. L'établissement de ces mesures est important, étant donné la faible quantité de valeurs de comparaison présentes dans la littérature. Les valeurs obtenues dans cette étude sont aussi intéressantes, car elles ont été prises à l'échelle à laquelle les CPM perçoivent la rigidité de leur environnement.

La présente étude montre de façon novatrice le comportement myogénique des cellules satellites en culture sur fibres en solution. Cela permet d'abord une observation de l'activation des cellules satellites dès l'isolement, et ensuite une comparaison de ce comportement entre les cellules adultes et âgées dans leur niche physiologique. La technique de culture de fibres en solution permet de considérer la rigidité comme facteur incident du comportement myogénique des cellules. On a aussi observé une similitude des capacités de prolifération et de différenciation des CPM adultes et âgées. Cette observation va dans le sens de la théorie des modifications du microenvironnement pour expliquer l'altération de la régénération dans le muscle âgé.

Enfin, on reproduit le comportement d'activation des cellules sur des hydrogels aux rigidités physiologiques, ce qui contribue à expliquer le comportement altéré des cellules satellites dans le tissu âgé et réitère l'importance des caractéristiques mécaniques des tissus dans le devenir des cellules. Nos travaux soulignent donc aussi la nécessité de tenir compte de la rigidité dans l'élaboration des biomatériaux utilisés en médecine régénératrice et en ingénierie tissulaire.

À la lumière de ces observations, il serait intéressant et important d'investiguer l'impact des protéines de revêtement sur la rigidité des fibres musculaires en culture. Les cellules relient leur cytosquelette à la MEC par l'intermédiaire de complexes d'adhésion de façon à sentir leur environnement par tractions successives. Sachant que certaines protéines de l'adhésome des intégrines permettent ou non un assemblage plus ou moins élaboré de ces complexes qui ont des effets sur diverses voies de signalisation. Il serait intéressant

d'investiguer l'élaboration de ces complexes par des marquages de la VINCULINE et des FAK. Puis, de vérifier s'il y a des réponses différentes aux rigidités précédemment évaluées selon les protéines de revêtement.

De plus, il serait intéressant de pousser vers l'avant la compréhension des mécanismes de signalisation observés jusqu'à maintenant. Plus particulièrement, les dernières observations effectuées dans les cellules MEF (mouse embryonic fibroblast) concernant l'activation du sentier FAK-CAS-RAC-Lamellipodin par les intégrines (BAE, MUI et al. 2014). Il serait également judicieux de vérifier si les ligands potentiels de l'intégrines  $\alpha_5\beta_1$  ou exclusif de l'  $\alpha_6\beta_1$  et l'  $\alpha_7\beta_1$ , respectivement la fibronectine et la laminine, peuvent avoir un effet sur l'augmentation de la prolifération que nous avons observé.



## REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à remercier le Pr Grenier pour sa disponibilité et son enthousiasme. Un merci spécial à Vanessa Couture et à toute l'équipe du laboratoire pour leur aide et leur participation directe et indirecte à ce projet.

Merci au Pr Michel Grandbois pour sa collaboration, et particulièrement à ses étudiants Thomas Söllradl et Élie Simard pour leur aide indispensable avec l'AFM ainsi que pour leur disponibilité à répondre ou à solutionner certains de mes problèmes.

Je remercie aussi mes colocataires pour leur compréhension à mon égard et particulièrement ma sœur, Sonia, pour son aide à la rédaction de ce mémoire et son support moral tout au long de ma maîtrise.

## LISTE DES RÉFÉRENCES

- Acharya, Ramanujam, Chinta et Rao (2011). "1,3-Diamido-calix[4]arene conjugates of amino acids: recognition of -COOH side chain present in amino acids, peptides, and proteins by experimental and computational studies." J Org Chem **76**(1): 127-37.
- Alnaqeeb, Al Zaid et Goldspink (1984). "Connective tissue changes and physical properties of developing and ageing skeletal muscle." J Anat **139 ( Pt 4)**: 677-89.
- Anderson, Wozniak et Mizunoya (2012). "Single muscle-fiber isolation and culture for cellular, molecular, pharmacological, and evolutionary studies." Methods Mol Biol **798**: 85-102.
- Arthur et Cooley (2012). "The effect of physiological stimuli on sarcopenia; impact of Notch and Wnt signaling on impaired aged skeletal muscle repair." Int J Biol Sci **8**(5): 731-60.
- Asakura et Rudnicki (2002). "Side population cells from diverse adult tissues are capable of in vitro hematopoietic differentiation." Exp Hematol **30**(11): 1339-45.
- Aumailley et Gayraud (1998). "Structure and biological activity of the extracellular matrix." J Mol Med (Berl) **76**(3-4): 253-65.
- Bae, Mui, Hsu, Liu, Cretu, Razinia, Xu, Pure et Assoian (2014). "A FAK-Cas-Rac-Lamellipodin Signaling Module Transduces Extracellular Matrix Stiffness into Mechanosensitive Cell Cycling." Sci Signal **7**(330): ra57.
- Bailey (2001). "Molecular mechanisms of ageing in connective tissues." Mech Ageing Dev **122**(7): 735-55.
- Bailey, Paul et Knott (1998). "Mechanisms of maturation and ageing of collagen." Mech Ageing Dev **106**(1-2): 1-56.
- Banks, Mozdzen, Harley et Bailey (2014). "The combined effects of matrix stiffness and growth factor immobilization on the bioactivity and differentiation capabilities of adipose-derived stem cells." Biomaterials.
- Baum et Duffy (2011). "Fibroblasts and myofibroblasts: what are we talking about?" J Cardiovasc Pharmacol **57**(4): 376-9.
- Beauchamp, Heslop, Yu, Tajbakhsh, Kelly, Wernig, Buckingham, Partridge et Zammit (2000). "Expression of CD34 and Myf5 defines the majority of quiescent adult skeletal muscle satellite cells." J Cell Biol **151**(6): 1221-34.
- Beauchamp, Morgan, Pagel et Partridge (1999). "Dynamics of myoblast transplantation reveal a discrete minority of precursors with stem cell-like properties as the myogenic source." J Cell Biol **144**(6): 1113-22.
- Benavides Damm et Egli (2014). "Calcium's Role in Mechanotransduction during Muscle Development." Cell Physiol Biochem **33**(2): 249-272.
- Bhushan (2007). Springer handbook of nanotechnology. Berlin ; New York, Springer.
- Binnig, Quate et Gerber (1986). "Atomic force microscope." Phys Rev Lett **56**(9): 930-933.
- Biressi et Rando (2010). "Heterogeneity in the muscle satellite cell population." Semin Cell Dev Biol **21**(8): 845-54.

- Bischoff (1986). "Proliferation of muscle satellite cells on intact myofibers in culture." Dev Biol **115**(1): 129-39.
- Boonen, Rosaria-Chak, Baaijens, Van Der Schaft et Post (2009). "Essential environmental cues from the satellite cell niche: optimizing proliferation and differentiation." Am J Physiol Cell Physiol **296**(6): C1338-45.
- Boontheekul, Hill, Kong et Mooney (2007). "Regulating myoblast phenotype through controlled gel stiffness and degradation." Tissue Eng **13**(7): 1431-42.
- Bourin, Bunnell, Casteilla, Dominici, Katz, March, Redl, Rubin, Yoshimura et Gimble (2013). "Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT)." Cytotherapy **15**(6): 641-8.
- Brack, Bildsoe et Hughes (2005). "Evidence that satellite cell decrement contributes to preferential decline in nuclear number from large fibres during murine age-related muscle atrophy." J Cell Sci **118**(Pt 20): 4813-21.
- Brack, Conboy, Roy, Lee, Kuo, Keller et Rando (2007). "Increased Wnt signaling during aging alters muscle stem cell fate and increases fibrosis." Science **317**(5839): 807-10.
- Bray (2006). "Notch signalling: a simple pathway becomes complex." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(9): 678-89.
- Brooks, Schuenke et Hikida (2009). "No change in skeletal muscle satellite cells in young and aging rat soleus muscle." J Physiol Sci **59**(6): 465-71.
- Brown (2013). "In the beginning there were soft collagen-cell gels: towards better 3D connective tissue models?" Exp Cell Res **319**(16): 2460-9.
- Burton, Vierck, Krabbenhoft, Bryne et Dodson (2000). "Methods for animal satellite cell culture under a variety of conditions." Methods Cell Sci **22**(1): 51-61.
- Canato, Dal Maschio, Sbrana, Raiteri, Reggiani, Vassanelli et Megighian (2010). "Mechanical and electrophysiological properties of the sarcolemma of muscle fibers in two murine models of muscle dystrophy: col6a1<sup>-/-</sup> and mdx." J Biomed Biotechnol **2010**: 981945.
- Carlson, Conboy, Hsu, Barchas, Jeong, Agrawal, Mikels, Agrawal, Schaffer et Conboy (2009). "Relative roles of TGF-beta1 and Wnt in the systemic regulation and aging of satellite cell responses." Aging Cell **8**(6): 676-89.
- Carlson, Hsu et Conboy (2008). "Imbalance between pSmad3 and Notch induces CDK inhibitors in old muscle stem cells." Nature **454**(7203): 528-32.
- Carlson, Suetta, Conboy, Aagaard, Mackey, Kjaer et Conboy (2009). "Molecular aging and rejuvenation of human muscle stem cells." EMBO Mol Med **1**(8-9): 381-91.
- Castronuovo, Pezzotti, Franzo, Di Lallo et Guasticchi (2011). "Early and late mortality in elderly patients after hip fracture: a cohort study using administrative health databases in the Lazio region, Italy." BMC Geriatr **11**: 37.
- Collado, Blasco et Serrano (2007). "Cellular senescence in cancer and aging." Cell **130**(2): 223-33.
- Collins, Olsen, Zammit, Heslop, Petrie, Partridge et Morgan (2005). "Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche." Cell **122**(2): 289-301.

- Conboy, Conboy, Smythe et Rando (2003). "Notch-mediated restoration of regenerative potential to aged muscle." Science **302**(5650): 1575-7.
- Conboy, Conboy, Wagers, Girma, Weissman et Rando (2005). "Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment." Nature **433**(7027): 760-4.
- Conboy et Rando (2012). "Heterochronic parabiosis for the study of the effects of aging on stem cells and their niches." Cell Cycle **11**(12): 2260-7.
- Cornelison, Filla, Stanley, Rapraeger et Olwin (2001). "Syndecan-3 and syndecan-4 specifically mark skeletal muscle satellite cells and are implicated in satellite cell maintenance and muscle regeneration." Dev Biol **239**(1): 79-94.
- Cossu et Sampaolesi (2007). "New therapies for Duchenne muscular dystrophy: challenges, prospects and clinical trials." Trends Mol Med **13**(12): 520-6.
- Cretu, Castagnino et Assoian (2010). "Studying the effects of matrix stiffness on cellular function using acrylamide-based hydrogels." J Vis Exp(42).
- Danoviz et Yablonka-Reuveni (2012). "Skeletal muscle satellite cells: background and methods for isolation and analysis in a primary culture system." Methods Mol Biol **798**: 21-52.
- Day, Shefer, Richardson, Enikolopov et Yablonka-Reuveni (2007). "Nestin-GFP reporter expression defines the quiescent state of skeletal muscle satellite cells." Dev Biol **304**(1): 246-59.
- Defranchi, Bonaccorso, Tedesco, Canato, Pavan, Raiteri et Reggiani (2005). "Imaging and elasticity measurements of the sarcolemma of fully differentiated skeletal muscle fibres." Microsc Res Tech **67**(1): 27-35.
- Deroanne, Lapiere et Nusgens (2001). "In vitro tubulogenesis of endothelial cells by relaxation of the coupling extracellular matrix-cytoskeleton." Cardiovasc Res **49**(3): 647-58.
- Di Iorio, Abate, Di Renzo, Russolillo, Battaglini, Ripari, Saggini, Paganelli et Abate (2006). "Sarcopenia: age-related skeletal muscle changes from determinants to physical disability." Int J Immunopathol Pharmacol **19**(4): 703-19.
- Discher, Janmey et Wang (2005). "Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate." Science **310**(5751): 1139-43.
- Discher, Mooney et Zandstra (2009). "Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells." Science **324**(5935): 1673-7.
- Doi, Endo, Yamakoshi, Yamanashi, Nishita, Fukada et Minami (2014). "Critical role of Frizzled1 in age-related alterations of Wnt/beta-catenin signal in myogenic cells during differentiation." Genes Cells.
- Dominici, Le Blanc, Mueller, Slaper-Cortenbach, Marini, Krause, Deans, Keating, Prockop et Horwitz (2006). "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement." Cytotherapy **8**(4): 315-317.
- Downey, Lauzier, Kloen, Klarskov, Richter, Hamdy, Faucheux, Scime, Balg et Grenier (2015). "Prospective heterotopic ossification progenitors in adult human skeletal muscle." Bone **71**: 164-70.
- Ducomps, Mauriege, Darche, Combes, Lebas et Doutreloux (2003). "Effects of jump training on passive mechanical stress and stiffness in rabbit skeletal muscle: role of collagen." Acta Physiol Scand **178**(3): 215-24.

- Edwards et O'brien (1980). "Modified assay for determination of hydroxyproline in a tissue hydrolyzate." Clin Chim Acta **104**(2): 161-7.
- Engler, Bacakova, Newman, Hategan, Griffin et Discher (2004). "Substrate compliance versus ligand density in cell on gel responses." Biophys J **86**(1 Pt 1): 617-28.
- Engler, Carag-Krieger, Johnson, Raab, Tang, Speicher, Sanger, Sanger et Discher (2008). "Embryonic cardiomyocytes beat best on a matrix with heart-like elasticity: scar-like rigidity inhibits beating." Journal of Cell Science **121**(22): 3794-3802.
- Engler, Griffin, Sen, Bonnemann, Sweeney et Discher (2004). "Myotubes differentiate optimally on substrates with tissue-like stiffness: pathological implications for soft or stiff microenvironments." J Cell Biol **166**(6): 877-87.
- Engler, Richert, Wong, Picart et Discher (2004). "Surface probe measurements of the elasticity of sectioned tissue, thin gels and polyelectrolyte multilayer films: Correlations between substrate stiffness and cell adhesion." Surface Science **570**(1-2): 142-154.
- Fan, Varshney, Ren, Cai et Wang (2009). "Synovium-derived mesenchymal stem cells: a new cell source for musculoskeletal regeneration." Tissue Eng Part B Rev **15**(1): 75-86.
- Faulkner, Larkin, Claflin et Brooks (2007). "Age-related changes in the structure and function of skeletal muscles." Clin Exp Pharmacol Physiol **34**(11): 1091-6.
- Feng, Van Der Zwaag, Stokman, Van Os et Coppes (2009). "Isolation and characterization of human salivary gland cells for stem cell transplantation to reduce radiation-induced hyposalivation." Radiother Oncol **92**(3): 466-71.
- Flanagan, Ju, Marg, Osterfield et Janmey (2002). "Neurite branching on deformable substrates." Neuroreport **13**(18): 2411-5.
- Fluck, Tunc-Civelek et Chiquet (2000). "Rapid and reciprocal regulation of tenascin-C and tenascin-Y expression by loading of skeletal muscle." J Cell Sci **113 ( Pt 20)**: 3583-91.
- Friedenstein, Chailakhyan, Latsinik, Panasyuk et Keiliss-Borok (1974). "Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo." Transplantation **17**(4): 331-40.
- Frontera, Hughes, Fielding, Fiatarone, Evans et Roubenoff (2000). "Aging of skeletal muscle: a 12-yr longitudinal study." J Appl Physiol (1985) **88**(4): 1321-6.
- Fujimaki, Hidaka, Asashima, Takemasa et Kuwabara (2014). "Wnt-Mediated Satellite Cell Conversion in Adult and Aged Mice Following Voluntary Wheel Running." J Biol Chem.
- Gallagher (2001). "Heparan sulfate: growth control with a restricted sequence menu." J Clin Invest **108**(3): 357-61.
- Gao, Kostrominova, Faulkner et Wineman (2008). "Age-related changes in the mechanical properties of the epimysium in skeletal muscles of rats." J Biomech **41**(2): 465-9.
- Gibson et Schultz (1983). "Age-related differences in absolute numbers of skeletal muscle satellite cells." Muscle Nerve **6**(8): 574-80.
- Gilbert, Havenstrite, Magnusson, Sacco, Leonardi, Kraft, Nguyen, Thrun, Lutolf et Blau (2010). "Substrate elasticity regulates skeletal muscle stem cell self-renewal in culture." Science **329**(5995): 1078-81.

- Gillies et Lieber (2011). "Structure and function of the skeletal muscle extracellular matrix." *Muscle Nerve* **44**(3): 318-31.
- Gnocchi, White, Ono, Ellis et Zammit (2009). "Further characterisation of the molecular signature of quiescent and activated mouse muscle satellite cells." *PLoS One* **4**(4): e5205.
- Gosselin, Adams, Cotter, McCormick et Thomas (1998). "Effect of exercise training on passive stiffness in locomotor skeletal muscle: role of extracellular matrix." *J Appl Physiol* (1985) **85**(3): 1011-6.
- Grenier, Remy-Zolghadri, Guignard, Bergeron, Labbe, Auger et Germain (2003). "Isolation and culture of the three vascular cell types from a small vein biopsy sample." *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **39**(3-4): 131-9.
- Grenier, Scime, Le Grand, Asakura, Perez-Iratxeta, Andrade-Navarro, Labosky et Rudnicki (2007). "Resident endothelial precursors in muscle, adipose, and dermis contribute to postnatal vasculogenesis." *Stem Cells* **25**(12): 3101-10.
- Gronthos, Mankani, Brahim, Robey et Shi (2000). "Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(25): 13625-30.
- Grounds, Sorokin et White (2005). "Strength at the extracellular matrix-muscle interface." *Scand J Med Sci Sports* **15**(6): 381-91.
- Haus, Carrithers, Trappe et Trappe (2007). "Collagen, cross-linking, and advanced glycation end products in aging human skeletal muscle." *J Appl Physiol* (1985) **103**(6): 2068-76.
- Hauschka et Konigsberg (1966). "The influence of collagen on the development of muscle clones." *Proc Natl Acad Sci U S A* **55**(1): 119-26.
- Hein et Franke (2002). "Are advanced glycation end-product-modified proteins of pathogenetic importance in fibromyalgia?" *Rheumatology (Oxford)* **41**(10): 1163-7.
- Hindle, Horning, Mellish et Lawler (2009). "Diving into old age: muscular senescence in a large-bodied, long-lived mammal, the Weddell seal (*Leptonychotes weddellii*)." *J Exp Biol* **212**(Pt 6): 790-6.
- Holle, Tang, Vijayraghavan, Vincent, Fuhrmann, Choi, Del Alamo et Engler (2013). "In situ mechanotransduction via vinculin regulates stem cell differentiation." *Stem Cells* **31**(11): 2467-77.
- Huard, Li et Fu (2002). "Muscle injuries and repair: current trends in research." *J Bone Joint Surg Am* **84-A**(5): 822-32.
- Hynes (2009). "The extracellular matrix: not just pretty fibrils." *Science* **326**(5957): 1216-9.
- Ingber (2006). "Cellular mechanotransduction: putting all the pieces together again." *FASEB J* **20**(7): 811-27.
- Irintchev, Zeschnigk, Starzinski-Powitz et Wernig (1994). "Expression pattern of M-cadherin in normal, denervated, and regenerating mouse muscles." *Dev Dyn* **199**(4): 326-37.
- Jang, Sinha, Cerletti, Dall'osso et Wagers (2011). "Skeletal muscle stem cells: effects of aging and metabolism on muscle regenerative function." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **76**: 101-11.

- Joe, Yi, Natarajan, Le Grand, So, Wang, Rudnicki et Rossi (2010). "Muscle injury activates resident fibro/adipogenic progenitors that facilitate myogenesis." Nat Cell Biol **12**(2): 153-63.
- Kaariainen, Jarvinen, Jarvinen, Rantanen et Kalimo (2000). "Relation between myofibers and connective tissue during muscle injury repair." Scand J Med Sci Sports **10**(6): 332-7.
- Katsumi, Orr, Tzima et Schwartz (2004). "Integrins in mechanotransduction." J Biol Chem **279**(13): 12001-4.
- Khatiwala, Peyton et Putnam (2006). "Intrinsic mechanical properties of the extracellular matrix affect the behavior of pre-osteoblastic MC3T3-E1 cells." Am J Physiol Cell Physiol **290**(6): C1640-50.
- Kim, Turnbull et Guimond (2011). "Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor." J Endocrinol **209**(2): 139-51.
- Kjaer (2004). "Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading." Physiol Rev **84**(2): 649-98.
- Konno et Suzuki (2000). "Myofiber length and myofiber arrangement in the antebrachial and leg muscles of sheep." Okajimas Folia Anat Jpn **77**(1): 5-10.
- Kook, Lee, Chung, Hwang, Lee, Kim et Lee (2008). "Cyclic mechanical stretch stimulates the proliferation of C2C12 myoblasts and inhibits their differentiation via prolonged activation of p38 MAPK." Mol Cells **25**(4): 479-86.
- Kovacheva, Hikim, Shen, Sinha et Sinha-Hikim (2010). "Testosterone supplementation reverses sarcopenia in aging through regulation of myostatin, c-Jun NH2-terminal kinase, Notch, and Akt signaling pathways." Endocrinology **151**(2): 628-38.
- Kragstrup, Kjaer et Mackey (2011). "Structural, biochemical, cellular, and functional changes in skeletal muscle extracellular matrix with aging." Scand J Med Sci Sports **21**(6): 749-57.
- Kraning-Rush et Reinhart-King (2012). "Controlling matrix stiffness and topography for the study of tumor cell migration." Cell Adh Migr **6**(3): 274-9.
- Kuznetsova, Starodubtseva, Yegorenkov, Chizhik et Zhdanov (2007). "Atomic force microscopy probing of cell elasticity." Micron **38**(8): 824-33.
- Ladoux et Nicolas (2012). "Physically based principles of cell adhesion mechanosensitivity in tissues." Rep Prog Phys **75**(11): 116601.
- Leblanc, Trenszt, Haroun, Drouin, Bergeron, Penton, Montanaro, Roux, Faucheux et Grenier (2011). "BMP-9-induced muscle heterotopic ossification requires changes to the skeletal muscle microenvironment." J Bone Miner Res **26**(6): 1166-77.
- Li et Izpisua Belmonte (2014). "Ageing: Genetic rejuvenation of old muscle." Nature **506**(7488): 304-5.
- Liu et Lee (2013). "In search of the pivot point of mechanotransduction: Mechanosensing of stem cells." Cell Transplant.
- Lu, Liu, Yang, Zhao, Wang, Gong, Han, Xu, Lu, Liu, Chen et Han (2006). "Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials." Haematologica **91**(8): 1017-26.

- Maggio, De Vita, Lauretani, Butto, Bondi, Cattabiani, Nouvenne, Meschi, Dall'aglio et Ceda (2013). "IGF-1, the cross road of the nutritional, inflammatory and hormonal pathways to frailty." *Nutrients* **5**(10): 4184-205.
- Malafaya, Silva et Reis (2007). "Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications." *Adv Drug Deliv Rev* **59**(4-5): 207-33.
- Marg, Haase, Neumann, Kouno et Morano (2010). "AHNAK1 and AHNAK2 are costameric proteins: AHNAK1 affects transverse skeletal muscle fiber stiffness." *Biochem Biophys Res Commun* **401**(1): 143-8.
- Mauro (1961). "Satellite cell of skeletal muscle fibers." *J Biophys Biochem Cytol* **9**: 493-5.
- Mayer (2003). "Integrins: redundant or important players in skeletal muscle?" *J Biol Chem* **278**(17): 14587-90.
- Meregalli, Farini, Sitzia et Torrente (2014). "Advancements in stem cells treatment of skeletal muscle wasting." *Front Physiol* **5**: 48.
- Michele et Campbell (2003). "Dystrophin-glycoprotein complex: post-translational processing and dystroglycan function." *J Biol Chem* **278**(18): 15457-60.
- Monnier, Bautista, Kenny, Sell, Fogarty, Dahms, Cleary, Lachin et Genuth (1999). "Skin collagen glycation, glycoxidation, and crosslinking are lower in subjects with long-term intensive versus conventional therapy of type 1 diabetes: relevance of glycated collagen products versus HbA1c as markers of diabetic complications. DCCT Skin Collagen Ancillary Study Group. Diabetes Control and Complications Trial." *Diabetes* **48**(4): 870-80.
- Montarras, Morgan, Collins, Relaix, Zaffran, Cumano, Partridge et Buckingham (2005). "Direct isolation of satellite cells for skeletal muscle regeneration." *Science* **309**(5743): 2064-7.
- Morissette Martin, Maux, Laterreur, Mayrand, V, Moulin et Fradette (2015). "Enhancing repair of full-thickness excisional wounds in a murine model: Impact of tissue-engineered biological dressings featuring human differentiated adipocytes." *Acta Biomater* **22**: 39-49.
- Morissette, Stricker, Rosenberg, Buranasombati, Levitan, Mittleman et Rosenzweig (2009). "Effects of myostatin deletion in aging mice." *Aging Cell* **8**(5): 573-83.
- Morrison, Loof, He et Simon (2006). "Salamander limb regeneration involves the activation of a multipotent skeletal muscle satellite cell population." *J Cell Biol* **172**(3): 433-40.
- Naito, Sumida, Nomura, Liu, Higo, Nakagawa, Okada, Sakai, Hashimoto, Hara, Shimizu, Zhu, Toko, Katada, Akazawa, Oka, Lee, Minamino, Nagai, Walsh, Kikuchi, Matsumoto, Botto, Shiojima et Komuro (2012). "Complement C1q activates canonical Wnt signaling and promotes aging-related phenotypes." *Cell* **149**(6): 1298-313.
- Nakai, Kawano, Oke, Nomura, Ohira, Fujita et Ohira (2010). "Mechanical stretch activates signaling events for protein translation initiation and elongation in C2C12 myoblasts." *Mol Cells* **30**(6): 513-8.
- Nass, Vogel, Hofmann, Presek, Silber et Simm (2010). "Glycation of PDGF results in decreased biological activity." *Int J Biochem Cell Biol* **42**(5): 749-54.



- Neuman et Logan (1950). "The determination of collagen and elastin in tissues." J Biol Chem **186**(2): 549-56.
- Oh et Kim (2013). "Reduced IGF signaling prevents muscle cell death in a *Caenorhabditis elegans* model of muscular dystrophy." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(47): 19024-9.
- Pasut, Jones et Rudnicki (2013). "Isolation and culture of individual myofibers and their satellite cells from adult skeletal muscle." J Vis Exp(73): e50074.
- Pennisi, Malaguarnera, Puglisi, Vinciguerra, Vacante et Malaguarnera (2013). "Neurotoxicity of acrylamide in exposed workers." Int J Environ Res Public Health **10**(9): 3843-54.
- Philippou, Papageorgiou, Bogdanis, Halapas, Sourla, Maridaki, Pissimissis et Koutsilieris (2009). "Expression of IGF-1 isoforms after exercise-induced muscle damage in humans: characterization of the MGF E peptide actions in vitro." In Vivo **23**(4): 567-75.
- Pierno, Camerino, Cannone, Liantonio, De Bellis, Digennaro, Gramegna, De Luca, Germinario, Danieli-Betto, Betto, Dobrowolny, Rizzuto, Musaro, Desaphy et Camerino (2013). "Paracrine effects of IGF-1 overexpression on the functional decline due to skeletal muscle disuse: molecular and functional evaluation in hindlimb unloaded MLC/mIgf-1 transgenic mice." PLoS One **8**(6): e65167.
- Ramaswamy, Palmer, Van Der Meulen, Renoux, Kostrominova, Michele et Faulkner (2011). "Lateral transmission of force is impaired in skeletal muscles of dystrophic mice and very old rats." J Physiol **589**(Pt 5): 1195-208.
- Rando (2010). "Epigenetics and aging." Exp Gerontol **45**(4): 253-4.
- Reddy (2004). "Cross-linking in collagen by nonenzymatic glycation increases the matrix stiffness in rabbit achilles tendon." Exp Diabetes Res **5**(2): 143-53.
- Renault, Thornell, Eriksson, Butler-Browne et Mouly (2002). "Regenerative potential of human skeletal muscle during aging." Aging Cell **1**(2): 132-9.
- Rowlands, George et Cooper-White (2008). "Directing osteogenic and myogenic differentiation of MSCs: interplay of stiffness and adhesive ligand presentation." Am J Physiol Cell Physiol **295**(4): C1037-44.
- Rowley et Mooney (2002). "Alginate type and RGD density control myoblast phenotype." J Biomed Mater Res **60**(2): 217-23.
- Ruster, Franke, Spath, Pongratz, Stein et Hein (2005). "Detection of elevated N epsilon-carboxymethyllysine levels in muscular tissue and in serum of patients with fibromyalgia." Scand J Rheumatol **34**(6): 460-3.
- Sacco, Doyonnas, Kraft, Vitorovic et Blau (2008). "Self-renewal and expansion of single transplanted muscle stem cells." Nature **456**(7221): 502-6.
- Sajko, Kubinova, Cvetko, Kreft, Wernig et Erzen (2004). "Frequency of M-cadherin-stained satellite cells declines in human muscles during aging." J Histochem Cytochem **52**(2): 179-85.
- Salerno, Dante, Patra et Diaspro (2010). "AFM measurement of the stiffness of layers of agarose gel patterned with polylysine." Microsc Res Tech **73**(10): 982-90.
- Sanes (2003). "The basement membrane/basal lamina of skeletal muscle." J Biol Chem **278**(15): 12601-4.
- Schiaffino et Mammucari (2011). "Regulation of skeletal muscle growth by the IGF1-Akt/PKB pathway: insights from genetic models." Skelet Muscle **1**(1): 4.

- Scime, Desrosiers, Trenz, Palidwor, Caron, Andrade-Navarro et Grenier (2010). "Transcriptional profiling of skeletal muscle reveals factors that are necessary to maintain satellite cell integrity during ageing." *Mech Ageing Dev* **131**(1): 9-20.
- Scime, Grenier, Huh, Gillespie, Bevilacqua, Harper et Rudnicki (2005). "Rb and p107 regulate preadipocyte differentiation into white versus brown fat through repression of PGC-1alpha." *Cell Metab* **2**(5): 283-95.
- Seale, Sabourin, Girgis-Gabardo, Mansouri, Gruss et Rudnicki (2000). "Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells." *Cell* **102**(6): 777-86.
- Semba, Nicklett et Ferrucci (2010). "Does accumulation of advanced glycation end products contribute to the aging phenotype?" *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **65**(9): 963-75.
- Shefer, Van De Mark, Richardson et Yablonka-Reuveni (2006). "Satellite-cell pool size does matter: defining the myogenic potency of aging skeletal muscle." *Dev Biol* **294**(1): 50-66.
- Shefer et Yablonka-Reuveni (2005). "Isolation and culture of skeletal muscle myofibers as a means to analyze satellite cells." *Methods Mol Biol* **290**: 281-304.
- Shigemura, Kubomura, Sato et Sato (2014). "Dose-dependent changes in the levels of free and peptide forms of hydroxyproline in human plasma after collagen hydrolysate ingestion." *Food Chem* **159**: 328-32.
- Shih, Kuo, Yang, Lee et Lee (2009). "Isolation and characterization of stem cells from the human parathyroid gland." *Cell Prolif* **42**(4): 461-70.
- Simard, Sollradl, Maltais, Boucher, D'orleans-Juste et Grandbois (2015). "Receptor for Advanced Glycation End-Products Signaling Interferes with the Vascular Smooth Muscle Cell Contractile Phenotype and Function." *PLoS One* **10**(8): e0128881.
- Snow, Fugere et Thompson (2007). "Advanced glycation end-product accumulation and associated protein modification in type II skeletal muscle with aging." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **62**(11): 1204-10.
- Takahashi, Hoshino, Kushida et Inoue (1995). "Direct measurement of crosslinks, pyridinoline, deoxypyridinoline, and pentosidine, in the hydrolysate of tissues using high-performance liquid chromatography." *Anal Biochem* **232**(2): 158-62.
- Tedesco, Dellavalle, Diaz-Manera, Messina et Cossu (2010). "Repairing skeletal muscle: regenerative potential of skeletal muscle stem cells." *J Clin Invest* **120**(1): 11-9.
- Travaglione, Messina, Fabbri, Falzano, Giammarioli, Grossi, Rufini et Fiorentini (2005). "Cytotoxic necrotizing factor 1 hinders skeletal muscle differentiation in vitro by perturbing the activation/deactivation balance of Rho GTPases." *Cell Death Differ* **12**(1): 78-86.
- Trenz, Haroun, Cloutier, Richter et Grenier (2010). "A muscle resident cell population promotes fibrosis in hindlimb skeletal muscles of mdx mice through the Wnt canonical pathway." *Am J Physiol Cell Physiol* **299**(5): C939-47.
- Trenz, Lucien, Couture, Sollradl, Drouin, Rouleau, Grandbois, Lacraz et Grenier (2015). "Increased microenvironment stiffness in damaged myofibers promotes myogenic progenitor cell proliferation." *Skelet Muscle* **5**: 5.
- Tse et Engler (2010). "Preparation of hydrogel substrates with tunable mechanical properties." *Curr Protoc Cell Biol* **Chapter 10**: Unit 10 16.
- Tse et Engler (2011). "Stiffness gradients mimicking in vivo tissue variation regulate mesenchymal stem cell fate." *PLoS One* **6**(1): e15978.

- Velloso (2008). "Regulation of muscle mass by growth hormone and IGF-I." Br J Pharmacol **154**(3): 557-68.
- Voermans, Bonnemann, Huijing, Hamel, Van Kuppevelt, De Haan, Schalkwijk, Van Engelen et Jenniskens (2008). "Clinical and molecular overlap between myopathies and inherited connective tissue diseases." Neuromuscul Disord **18**(11): 843-56.
- Wang, Chang, Brixius, Wickstrom, Montanez, Thievensen, Schwander, Muller, Bloch, Mayer et Fassler (2008). "Integrin-linked kinase stabilizes myotendinous junctions and protects muscle from stress-induced damage." J Cell Biol **180**(5): 1037-49.
- Wang, Dembo et Wang (2000). "Substrate flexibility regulates growth and apoptosis of normal but not transformed cells." Am J Physiol Cell Physiol **279**(5): C1345-50.
- Wen, Vincent, Fuhrmann, Choi, Hribar, Taylor-Weiner, Chen et Engler (2014). "Interplay of matrix stiffness and protein tethering in stem cell differentiation." Nat Mater **13**(10): 979-87.
- Willems, Miller et Stauber (2001). "Force deficits after stretches of activated rat muscle-tendon complex with reduced collagen cross-linking." Eur J Appl Physiol **85**(5): 405-11.
- Williams et Hare (2011). "Mesenchymal stem cells: biology, pathophysiology, translational findings, and therapeutic implications for cardiac disease." Circ Res **109**(8): 923-40.
- Wood, Kayupov, Gumucio, Mendias, Claflin et Brooks (2014). "Intrinsic stiffness of extracellular matrix increases with age in skeletal muscles of mice." J Appl Physiol (1985).
- Wu, Fannin, Rice, Wang et Blough (2011). "Effect of aging on cellular mechanotransduction." Ageing Res Rev **10**(1): 1-15.
- Yin, Price et Rudnicki (2013). "Satellite cells and the muscle stem cell niche." Physiol Rev **93**(1): 23-67.
- Zuk, Zhu, Mizuno, Huang, Futrell, Katz, Benhaim, Lorenz et Hedrick (2001). "Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies." Tissue Eng **7**(2): 211-28.

## ANNEXES

### **Annexe 1 Autorisations pour les emprunts de figures**

(Extraits de communication par courrier électronique)

#### **Figures de Schaffino et al., 2011 (page 28)**

"Dunnacan Suarez" <info@biomedcentral.com>

mar. 2016-03-08 06:09

À :

Andre-Jean Rouleau;

Action Items

Dear Dr. Rouleau,

Thank you for contacting BioMed Central.

The BioMed Central copyright and license agreement allows anyone to create a "Derivative Work", and that can be an amended or reorganized version of the article. Please note that this also applies for figures and tables as well. A Derivative work must make acknowledgements to the original as outlined in clause 4.2 (please see below):

<http://www.biomedcentral.com/about/license>

In summary, the Derivative work must:

- a) acknowledge that the original article is published in open access using our statement (see example below)
- b) give the original author(s) credit
- c) state the Uniform Resource Identifier - as a minimum this should be the journal citation; we suggest that the DOI and URL are also included
- d) include an acknowledgement (e.g., "This [article/chapter] has been derived from the original publication "[title]" by Original Author(s)").

The license states that "at a minimum such credit will appear where any other comparable authorship credit appears and in a manner at least as prominent as such other comparable authorship credit." For any reuse of open access articles in scientific publications this means that the article must at least be included in the reference list. However, for a derivative work, we suggest that a more prominent note may be appropriate - perhaps an author's note, an acknowledgements section, or a footnote on the first page, or similar.

Example wording might be along the lines of:

This work has been adapted from the original article "[Effects of thermal environment on sleep and circadian rhythm]" by [Kazue Okamoto-Mizuno, Koh Mizuno]. Journal of Physiological Anthropology 2012, 31:14 (doi:10.1186/1880-6805-31-14 ; <http://www.jphysiolanthropol.com/content/31/1/14>). The original article is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

If you have any questions please do not hesitate to contact me.

Best wishes,

Joel Lagmay  
Customer Services  
[info@biomedcentral.com](mailto:info@biomedcentral.com)  
[www.biomedcentral.com](http://www.biomedcentral.com)  
-----Your Question/Comment -----

Thanks,

Actually i modified the figure to suit my needs. I join the figure for you to see. I didn't modified the image but i joined to figures in one.

Can i still count on your permission to use it?

Cordialement,

André-Jean Rouleau

Laboratoire Guillaume Grenier  
Département de Chirurgie orthopédique  
Tel (819) 820-6868 ext 13829  
Centre de Recherche Clinique Étienne-Lebel, Local: 3860

Université de Sherbrooke  
3001 12e Ave Nord  
Sherbrooke, Québec  
J1H 5N4

---

De : "Dunnican Suarez" <[info@biomedcentral.com](mailto:info@biomedcentral.com)> <[info@biomedcentral.com](mailto:info@biomedcentral.com)>

Envoyé : 8 mars 2016 05:42

À : Andre-Jean Rouleau

Objet : 00616709 re:Autorisation to use figures needed.

Dear Dr. Rouleau,

Thank you for contacting BioMed Central.

Reproduction of figures or tables is permitted free of charge and without formal written permission from the publisher or the copyright holder, provided that the figure/table is original, BioMed Central is duly identified as the original publisher, and that proper attribution of authorship and the correct citation details are given as acknowledgement.

If you have any questions please do not hesitate to contact me.

Best wishes,

Joel Lagmay  
Customer Services  
info@biomedcentral.com  
[www.biomedcentral.com](http://www.biomedcentral.com)  
-----Your Question/Comment -----

Greetings,

i'm a finishing student (M.Sc.) of the University of Sherbrooke, Canada. I've found a article that you published in 2011 really useful and i want to get the autorisation to use some figures of it in my thesis.

The article is : Regulation of skeletal muscle growth by the IGF1-Akt/PKB pathway:  
insights from genetic models

Authors:  
Schiaffino, S.  
Mammucari, C.

Journal: Skelet Muscle, 2011

DOI: 10.1186/2044-5040-1-4

PMCID: 3143906

Can you help me to get this autorisation?

Cordialement,

André-Jean Rouleau

Laboratoire Guillaume Grenier  
Département de Chirurgie orthopédique

Université de Sherbrooke  
3001 12e Ave Nord

Tel (819) 820-6868 ext 13829  
Centre de Recherche Clinique Étienne-Lebel, Local: 3860

Sherbrooke, Québec  
J1H 5N4

**Figure de Thomas Söllradl (page 47)**

Thomas Söllradl  
mar. 2016-03-08 08:31  
Hello Andre-Jean,

You have my authorization for using this figure in your thesis.

Yes, everything is going fine so far. Hope you are now done with your thesis!

Regards,  
Thomas

Andre-Jean Rouleau  
mar. 2016-03-08 05:41  
Éléments envoyés  
À :  
Thomas Söllradl;  
I Thomas,

i hope everything's fine for you.

I need your authorization to use your image that i've placed in my thesis.

Thanks, and i wish you well,

Cordialement,

André-Jean Rouleau

Laboratoire Guillaume Grenier  
Département de Chirurgie orthopédique  
Tel (819) 820-6868 ext 13829  
Centre de Recherche Clinique Étienne-Lebel, Local: 3860

Université de Sherbrooke  
3001 12e Ave Nord  
Sherbrooke, Québec  
J1H 5N4