

Faculté des sciences de la motricité

Effet de la contraction musculaire sur la libération de vésicules extracellulaires et leur contenu antioxydant

Auteur : Théo MAHY

Promoteur : Dr. Geoffrey WARNIER

Co-promotrice : Pre. Louise DELDICQUE

Année académique 2024-2025

Master en sciences de la motricité, orientation éducation physique [120.0] -
EDPH2MA – Finalité approfondie

UCLouvain FSM : Déclaration d'utilisation des aides et outils Intelligence Artificielle (IA)

J'ai utilisé l'IA pour ce projet :	☒ Oui ☐ Non
------------------------------------	---

Si vous avez utilisé l'IA dans ce travail, veuillez préciser comment ci-dessous :

Texte (par exemple, vérification orthographique, génération de texte, production d'idées, ...)

Le cas échéant, veuillez résumer (500 caractères maximum):

- J'ai utilisé l'IA (chat GPT) pour de la reformulation syntaxique ou de la recherche du vocabulaire adéquat à utiliser

Image

Le cas échéant, veuillez résumer (500 caractères maximum):

- /

Code, aide à la programmation, ou algorithmes

Le cas échéant, veuillez résumer (500 caractères maximum):

- /

Autres utilisations

Le cas échéant, veuillez résumer (500 caractères maximum):

- J'ai utilisé l'IA (DeepL) pour la traduction de certains termes
- J'ai utilisé l'IA (chat GPT) pour dialoguer et mieux comprendre certains concepts de biologie
- J'ai utilisé l'IA (chat GPT) pour mieux comprendre et utiliser les logiciels graphpad, Fiji, Jamovi
- J'ai utilisé l'IA (EndNote) pour la réalisation de la bibliographie

Je connais les règles de l'UCLouvain en matière d'intelligence artificielle. Je déclare que toute utilisation d'aides ou d'outils d'intelligence artificielle est explicitement mentionnée dans le présent formulaire de déclaration.

Nom	Mahy	Prénom	Théo
-----	------	--------	------

MAHY T.

Remerciements :

Je tiens tout d'abord à remercier profondément mes parents pour m'avoir offert la possibilité de poursuivre un parcours universitaire avec la tête pleine d'envie et de curiosité pour l'apprentissage, particulièrement maman pour son soutien inconditionnel tout au long de ce parcours.

Un grand merci au Docteur Geoffrey Warnier, mon superviseur, pour ses précieux conseils. Sa capacité à m'orienter, tout en me laissant une grande liberté dans mon travail, m'a permis de faire avancer ce projet sereinement.

Je remercie également ma co-superviseuse, Madame la Professeure Louise Deldicque, pour son expertise et ses précieux retours qui m'ont aidé à améliorer de nombreux aspects de cette recherche.

Je tiens à remercier mes collègues et toute l'équipe du laboratoire de ces deux dernières années. Un grand merci Nancy, Alexandre, Sophie, Camille L., Arthur, Thibault, (mini)Geoffrey, Camille V., Ilyano, Anna. Merci pour vos conseils, ainsi que pour la bonne humeur qui règne dans le labo.

Je remercie également mes amis et mon entourage, toujours présents pour me soutenir et m'offrir une pause sur le vélo ou en courant dans le bois lorsque j'en avais besoin. Merci à mes deux sœurs, Aude pour le côté scientifique et Manon pour le côté sportif.

Enfin, je tiens à remercier Julie pour sa patience et sa tendresse.

SOMMAIRE

Sommaire.....	iii
Liste des Abréviations.....	v
1 Introduction.....	1
1.1 Fonction régulatrice de l'exercice physique	1
1.1.1 Homéostasie.....	1
1.1.2 Effet protecteur de l'exercice physique	2
1.1.3 Exerkines et myokines, médiateurs des adaptations à l'exercice	3
1.2 Vésicules extracellulaires.....	5
1.2.1 Découverte des vésicules extracellulaires.....	5
1.2.2 Classification des vésicules extracellulaires	7
1.2.3 Biogénèse, sécrétion des vésicules extracellulaires	7
1.2.4 Contenu des vésicules extracellulaires	10
1.2.5 Interaction des vésicules extracellulaires avec les cellules réceptrices	10
1.2.6 Fonctions des vésicules extracellulaires	12
1.3 Exercice physique et vésicules extracellulaires	13
1.3.1 Effet de l'exercice sur les vésicules extracellulaires	13
1.3.2 Impact du muscle squelettique et de l'activité contractile sur les vésicules extracellulaires	16
1.3.3 Enzymes antioxydantes.....	19
2 Objectifs du travail	20
3 Méthodes.....	20
3.1 Protocole expérimental.....	20
3.2 Culture de cellules musculaires primaires humaines	21
3.3 Stimulation électrique par impulsion.....	23
3.4 Isolation des vésicules extracellulaires par centrifugation différentielle et ultracentrifugation	24
3.5 Extraction protéique	26
3.6 Dosage protéique.....	26
3.7 Western blotting.....	27

3.8	Statistiques.....	28
4	Résultats.....	28
4.1	Homogénéité des paramètres myogéniques.....	28
4.2	Meilleure isolation des EVs avec le rotor TLA-55	29
4.3	Validation de la signature vésiculaire et de la pureté des EVs isolés	30
4.4	Enrichissement en marqueurs vésiculaires et en antioxydants des EVs libérés dans le milieu de culture après stimulation	31
5	Discussion.....	34
5.1	Comparaison du rendement des 2 ultracentrifugeuses	34
5.2	Validation de l'isolation.....	35
5.3	Libération de vésicules extracellulaires dans le milieu de culture après l'électrostimulation	36
5.4	Enrichissement antioxydant des vésicules extracellulaires provenant du milieu de culture des myotubes stimulés.....	39
5.5	Limites et Perspectives.....	41
6	Conclusion.....	43
7	Bibliographie	44
8	Annexe	52

LISTE DES ABRÉVIATIONS

[...] = Concentration

ADN = Acide désoxyribonucléique

ALG2 = Alpha-1,3/1,6-mannosyltransférase

ALIX = Protéine interagissant avec la mort cellulaire programmée 6

AMP = Adénosine monophosphate

AMPK = Protéine kinase activée par l'AMP

AMPK α 1 = Sous-unité 1 α de l'AMPK

ANGPTL4 = Angiopoïétine de type 4

ARF6 = Facteur 6 de ribosylation de l'ADP

ARN = Acide ribonucléique

ARNase = Ribonucléase

BDNF = Facteur neurotrophique dérivé du cerveau

CAMK = Protéine kinase dépendante du calcium / de la calmoduline

CD11a = Intégrine alpha L

CD9, CD63, CD81 = Classe de différenciation 9, 63, 81

COL-1 = Collagène de type I

CTR = Récepteur de la calcitonine

CTRL = Contrôle

Cys-SH = Cystéine

Cys-SOH = Cystéine sulfénique

DMEM = Milieu Eagle modifié de Dulbecco

DMSO = Diméthylsulfoxyde

EGF = Facteur de croissance épidermique

EPS = Stimulation électrique par impulsion

ESCRT = Complexe de tri endosomal requis pour le transport

EVs = Vésicules extracellulaires

FBS = Sérum de veau fœtal

FC = Fréquence Cardiaque

FGF = Facteur de croissance des fibroblastes (ex : FGF21)

Flot1 = Flotilline-1

GTP = Guanosine triphosphate

H₂O₂ = Péroxyde d'hydrogène

HEPES = acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique

HRS = Substrat de la tyrosine kinase régulée par le facteur de croissance des hépatocytes

HSP/HSC 60, HSP/HSC 70 = Protéine de choc thermique 60, 70

ICAM-1 = Molécule d'adhésion intercellulaire 1

IGF = Facteur de croissance de type insuline

IL-6/IL-7 = Interleukine 6/ Interleukine 7

ISEV = Société internationale des vésicules extracellulaires

kDa = kilodalton

LC3 = Protéines associées aux microtubules 1A/1B

Lymphocytes NK = Lymphocytes tueurs naturels

MAPK = Protéine kinase active par le mitogène

MEF2 = Facteur d'amplification myocytaire 2

miR = microARN

MISEV = Informations minimales pour les études des vésicules extracellulaires

Mmp9 = Métalloprotéase matricielle 9

MRFs = Facteurs de régulation myogéniques

mTOR = Cible mammalienne de la rapamycine

MVB = Corps multivésiculaires

NAD⁺ = Nicotinamide Adénine Dinucléotide

NADPH = Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate

NF-κB = Facteur nucléaire kappa B

NFATc1 = Facteur nucléaire des lymphocytes T activés

NRF2 = Facteur nucléaire erythroïde 2 lié au facteur 2

NTA= Analyse par suivi des nanoparticules

O₂⁻ = Superoxyde

OCN = Ostéocalcine

P70S6K = Protéine kinase ribosomique p70S6

PBS = Solution saline tamponnée au phosphate

PGC-1α = Coactivateur 1 alpha du récepteur activé par les proliférateurs de peroxysomes gamma

pH = potentiel hydrogène

PRDX = Péroxyredoxine

PVDF = Polifluorure de vinylidène
ROS = Radicaux libres
SDS = Dodécylsulfate de sodium
SEM = Erreur standard de la moyenne
SIRT1 = Sirtuine 1
SkM-EVs = Vésicules extracellulaires dérivées du muscle squelettique
SNARE = complexe SNARE (
SOD2 = Superoxyde dismutase 2
TLR = Récepteurs de type Toll
TNF α = Facteur de nécrose tumorale alpha
TOM20 = Translocase de la membrane mitochondriale externe 20
TSG101 = Gène de susceptibilité tumorale 101
VO₂ max = Volume maximal de dioxygène
VO₂ peak = Valeur maximale de consommation d'oxygène atteinte ne répondant pas aux critères stricts du VO₂ max
VSP4 = Protéine de tri vacuolaire 4
VTA1 = Trafic vésiculaire 1

1 INTRODUCTION

1.1 Fonction régulatrice de l'exercice physique

1.1.1 Homéostasie

L'état d'équilibre dans le corps humain est un concept essentiel en physiologie. Certains paramètres sont relativement stables, comme la température corporelle, la balance électrolytique, les niveaux de glucose et le pH sanguin. Cependant, nous vivons dans un environnement changeant et fluctuant. La maintenance de notre organisme (compartiment intérieur) dans un état d'équilibre permettant des conditions fonctionnelles est appelée homéostasie. Claude Bernard (1813-1878), le fondateur de la médecine expérimentale disait: " La constance du milieu intérieur est la condition d'une vie libre et indépendante"[1]. Quelques décennies plus tard, c'est un autre pionnier de la physiologie, Walter Bradford Cannon (1871-1945), qui fut le premier à se référer à l'homéostasie comme : « la capacité de l'organisme à maintenir son environnement interne relativement stable malgré les fluctuations de l'environnement externe ». L'homéostasie est, dans un sens, une balance dynamique pouvant s'appliquer aux différentes échelles du vivant, chacune interagissant et s'influençant mutuellement [2]. Au niveau cellulaire, les membranes lipidiques forment une limite, une séparation. Les échanges nécessaires à la restauration d'éventuels déséquilibres sont régulés par des transporteurs membranaires et des molécules de signalisation. Ces mécanismes reposent sur des récepteurs qui détectent les perturbations et des régulateurs, agissant par rétrocontrôle négatif, pour corriger ces déséquilibres [3]. Lorsque ces régulations ne fonctionnent plus correctement, non seulement l'homéostasie cellulaire est perturbée, mais aussi la communication entre les cellules et leur environnement, ce qui peut conduire à des pathologies.

Les comportements sédentaires résultant de notre société moderne favorisent ainsi l'apparition de nombreuses pathologies [4] telles que l'obésité, l'hypertension, l'ostéoporose, les maladies des muscles squelettiques, les maladies cardiovasculaires, le syndrome métabolique [4] ou encore les cancers [5].

1.1.2 Effet protecteur de l'exercice physique

L'exercice physique agit comme un stimulus externe sur l'organisme et perturbe transitoirement l'homéostasie [6]. Au niveau cellulaire, cela inclut l'utilisation accrue des substrats énergétiques (glucides et lipides), l'augmentation de la production de radicaux libres (ROS) et, à une échelle plus globale, on observe une élévation de la température corporelle, une augmentation de la fréquence cardiaque (FC) et des modifications du débit sanguin pour répondre aux besoins métaboliques accrus. Suite à ces perturbations, le corps va mettre en place des processus pour s'adapter. Par exemple, l'activité mitochondriale intense augmente le stress oxydatif de manière transitoire. Sur le long terme, on observe une amélioration du système antioxydant, réduisant le stress oxydatif [7]. Des voies de signalisation spécifiques sont ainsi activées dans divers systèmes (cardiovasculaire, respiratoire, musculaire et métabolique). Parmi les voies de signalisation clés activées par l'exercice, le coactivateur transcriptionnel PGC-1 α joue un rôle prépondérant. Ce facteur est crucial pour la biogenèse mitochondriale et le métabolisme énergétique, favorisant l'adaptation à l'exercice aérobie [8]. Ensuite, l'axe mTOR, lui, impliqué dans la régulation de la synthèse protéique et l'hypertrophie musculaire, montre une réponse particulièrement marquée après des exercices de musculation [9]. Dans le dogme central de la biologie, les facteurs de transcription activés par les deuxièmes messagers régulent la transcription des gènes dans le but final d'assembler des protéines [10]. Ces deuxièmes messagers tels que l'AMPK (protéine-kinase activée par l'AMP), les CAMK (protéines-kinases dépendantes du calcium et de la calmoduline) et les MAPK (protéines-kinases activées par mitogène) sont proportionnellement activés en réponse aux premiers messagers. Ceux-ci sont des changements transitoires : de l'énergie cellulaire, des niveaux de calcium, du stress mécanique, de la production de ROS ou encore de divers métabolites durant l'exercice physique [6, 11]. Lorsque l'exercice est répété régulièrement, les effets de chaque séance s'additionnent et entraînent une adaptation à long terme, notamment du muscle squelettique pour soutenir un nouveau seuil d'endurance ou de force [12]. Ces adaptations contribuent à améliorer l'efficacité du corps à maintenir l'homéostasie. Par exemple, une activité physique régulière peut améliorer la sensibilité à l'insuline, ce qui permet une régulation plus fine de la glycémie, réduisant ainsi le risque de maladies métaboliques comme le diabète de type 2. L'exercice est probablement l'un des traitements les plus efficaces contre les

maladies chroniques, dont la prévalence ne cesse d'augmenter [13]. L'exercice varie selon certaines modalités (type, fréquence, durée, intensité, distribution d'intensité, durée de l'intervalle, ...) ainsi que les conditions dans lesquelles il est pratiqué (environnementale : hypoxie, chaleur, froid, ... ; nutritionnelle : glycogène bas, ...) [11, 12]. L'interaction des différentes modalités impacte les réponses physiologiques. Il faut donc choisir les modalités en fonction des réponses attendues [12]. Une meilleure compréhension du fonctionnement des messagers cellulaires et intercellulaires permettrait d'améliorer l'intervention sur la physiologie humaine.

1.1.3 Exerkines et myokines, médiateurs des adaptations à l'exercice

Parmi les mécanismes envisagés pour expliquer l'adaptation à l'exercice, la libération de molécules dans la circulation semble de plus en plus admise [14]. En effet, en réponse à l'exercice, une série d'organes libèrent des molécules diverses (protéines, ARN, métabolites,...) dans la circulation. Ces messagers, appelés "exerkines" expliquent en partie l'effet multi-systémique que l'on observe en terme d'adaptations induites par l'exercice. Ces molécules bioactives peuvent participer à la communication inter-cellulaire de manière paracrine ou endocrine [15]. A ce jour, il a été montré que de nombreux tissus sont capables de sécréter des exerkines, mais une attention particulière a été portée aux tissus suivants : musculaire, adipocytaire, hépatique, pancréatique, osseux et nerveux mais également ceux du système immunitaire et de l'intestin. Les molécules sécrétées par ces tissus possèdent une appellation spécifique : myokines pour le muscle, adipokines pour le tissu adipeux, hépatokines pour le foie, ostéokines pour le tissu osseux,... [15-17]. Parmi les myokines, l'interleukin-6 (IL-6) est l'une des plus étudiées. Elle est notamment activée lorsque les niveaux de glycogène, une source d'énergie majeure pour la contraction des muscles [18], sont bas [19], via la voie TLR/NF- κ B, impliquée dans les processus inflammatoires. Elle favorise l'augmentation de la production hépatique de glucose en inhibant l'activité de la glycogène synthase et en accélérant celle de la glycogène phosphorylase [20]. Il semblerait que la durée d'exercice soit un facteur important dans la sécrétion d'IL-6 par le muscle. En effet, on a observé une multiplication d'IL6 par 5 après 30 minutes de course à 75 % de VO₂ max jusqu'à une multiplication par 100 pendant un marathon (donc correspondant à une intensité relativement similaire mais une durée plus

conséquence) [15, 21]. En dehors de son rôle métabolique, l'IL-6 joue un rôle immunitaire en favorisant l'action des lymphocytes NK, et est associée à une protection contre le cancer [22]. Elle est également impliquée dans la connexion muscle-cerveau, en stimulant la production du BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) agissant dans les processus de mémoire et d'apprentissage [23]. Les données présentées ci-dessus font référence aux effets de l'IL-6 lors de l'augmentation transitoire que l'on retrouve typiquement pendant et après un exercice. A contrario, une concentration élevée d'IL-6 au repos est associée à un état inflammatoire chronique et n'est pas considérée comme un marqueur positif [21].

L'IL-7, quant à elle, est essentielle au développement des cellules immunitaires T et B. Elle pourrait également jouer un rôle sur les cellules satellites musculaires, impliquées dans la régénération et la croissance musculaire [19].

L'Irisine, le FGF21 et la meteorin-like protein sont des myokines impliquées dans la communication entre le muscle et le tissu adipeux. Leur action conduit à l'induction de gènes thermogéniques et au brunissement du tissu adipeux, favorisant ainsi une meilleure régulation de l'homéostasie énergétique [18].

Outre ces myokines, d'autres médiateurs métaboliques sont notamment produits par le tissu adipeux et le foie. [16]. La Follistatin et l'ANGPTL4 produits par le foie agissent respectivement sur le métabolisme des lipides et sur la masse musculaire [16]. En cas d'obésité, certaines adipokines jouent un rôle clé. La leptine augmente le niveau de cytokine pro-inflammatoire tel que l'IL-6 et le TNF α , tout en réduisant la sécrétion d'adiponectine, une hormone qui favorise le métabolisme des lipides et la sensibilité à l'insuline. L'hyperlipidémie entraînerait donc une résistance à la leptine, et freinerait l'oxydation des acides gras [17].

Nous avons vu ci-dessus, qu'une variété de protéines était sécrétée par différents tissus. Il est important de préciser que plusieurs classes de molécules sont libérées par ces derniers et notamment à l'exercice. C'est le cas des microARN [24, 25]. Ceux-ci sont de petites molécules d'ARN non codantes, d'une longueur typique de 21 à 23 nucléotides, qui jouent un rôle crucial dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes. En se fixant à l'ARN messager (ARNm), les microARNs inhibent la traduction et donc la synthèse de protéines spécifiques.

Sur l'ensemble du sécrétome, désignant l'ensemble des molécules sécrétées par une cellule présente dans la circulation sanguine et comprenant enzymes, cytokines, hormones, facteurs de croissance, une fraction de ces molécules est rapidement interceptée et éliminée du sang par les macrophages hépatiques (cellules de Kupffer) [26] et est facilement inactivable par les protéases et les ARNases présentes dans le plasma. Ce phénomène réduit ainsi la quantité de facteurs circulants dépourvus d'une bicouche lipidique protectrice atteignant les cellules cibles [26]. Pour éviter leur dégradation et pour permettre d'atteindre les cellules cibles, il semblerait qu'une partie des exerkines sécrétées puisse être transportée par des petites structures appelées les vésicules extracellulaires (EVs) [16, 24]. Par ce biais, les exerkines pourraient être envoyées sélectivement vers des destinations spécifiques, optimisant ainsi la communication intercellulaire.

1.2 Vésicules extracellulaires

Les directives l'International Society for Extracellular Vesicles (ISEV), en particulier les Minimal Information for Studies of Extracellular Vesicles (MISEV), définissent les EVs comme « toute particule naturellement libérée par la cellule qui est limitée par une bicouche lipidique et ne peut pas se répliquer » [27]. Leur taille varie généralement de 20 à 1000 nanomètres, et ils peuvent être classés en différents sous-groupes en fonction de leur taille et de leur origine biologique. Ces EVs sont absolument partout. Ils ont été retrouvés dans divers fluides corporels étudiés tels que le sang, l'urine, la salive, le liquide céphalorachidien, le lait maternel et le sperme, ainsi que dans les fèces [28, 29], et ont été identifiés dans les trois domaines phylogénétiques de la vie (Archaea, Bacteria, Eukarya)[30-32], démontrant leur importance biologique et évolutive. Il est également important de considérer que nous ingérons et rencontrons quotidiennement des vésicules extracellulaires par le biais de notre alimentation, par exemple dans les aliments fermentés [33]. Actuellement le domaine des EVs est très étudié avec de nombreuses perspectives, notamment diagnostiques [34] et thérapeutiques [35].

1.2.1 Découverte des vésicules extracellulaires

L'histoire des vésicules extracellulaires remonte à plusieurs décennies (Fig. 1A):

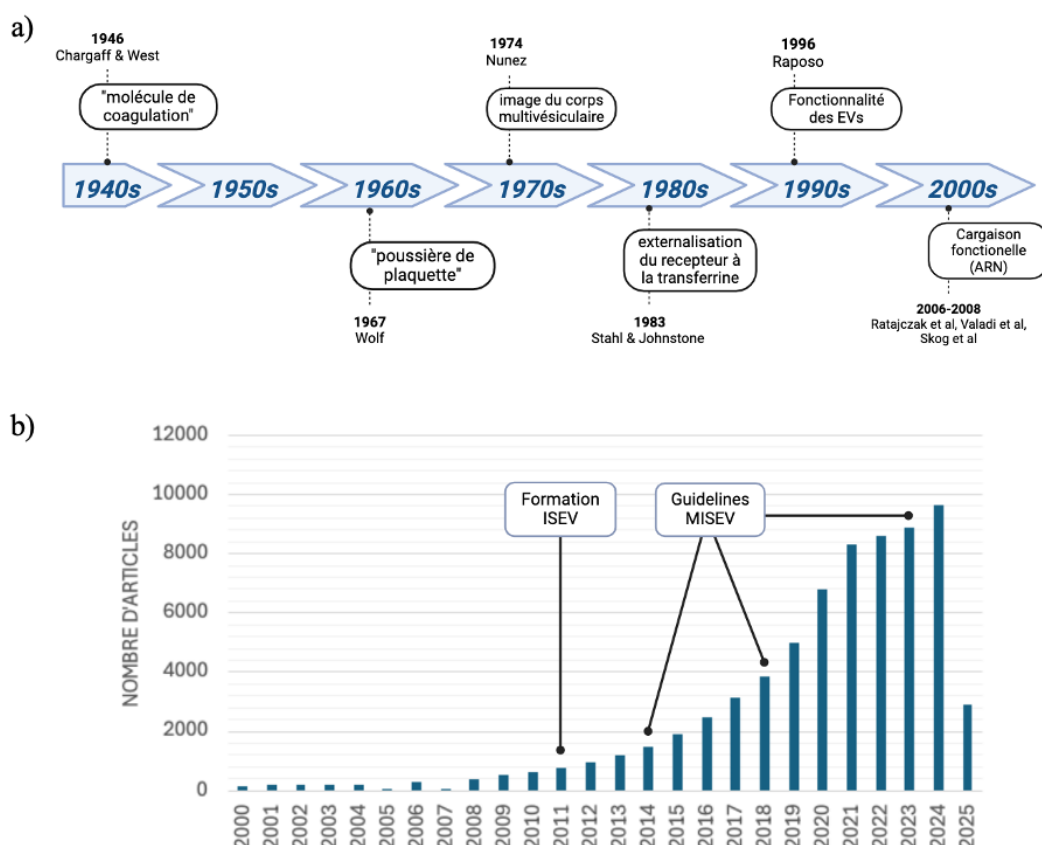


Fig. 1 – Histoire des EVs : a) Ligne du temps des étapes clés dans la recherche sur les vésicules extracellulaires (adapté de Couch et al., 2021). b) évolution du nombre d'articles sur les EVs (recherche Pubmed avec mots clés : Extracellular Vesicle ou exosome (mis à jour de Delcorte 2022)).

Elles ont été découvertes pour la première fois dans les années 40 en tant que "molécules de coagulation" [30] et plus tard décrites comme "poussières de plaquette" par Peter Wolf en 1967 [36]. En 1983, deux publications simultanées, prenant chacune des directions et des perspectives différentes, ont démontré la libération des récepteurs de la transferrine par l'intermédiaire de petites vésicules. Ces récepteurs sont responsables de l'absorption du fer au cours de la maturation des réticulocytes [37, 38]. Les vésicules relarguées externalisant des protéines membranaires ont ensuite été nommées « exosomes ». A leur découverte, les EVs étaient plutôt considérées comme des contenants de déchets ou des débris cellulaires. Toutefois, dix ans plus tard, en 1996, Graca Raposo publia un article révolutionnaire sur les lymphocytes, suggérant que les exosomes joueraient un rôle dans la présentation d'antigènes [39]. Cet article proposait l'idée que les exosomes pouvaient jouer un rôle dans le transfert d'information. L'année 2007 est une autre

étape importante, avec les travaux du groupe Lotvall démontrant le transfert fonctionnel d'exosomes contenant de l'ARN messager et de micro-ARN d'un type de cellule à un autre [40]. Grâce à un test de traduction in vitro (traduction ARNm en protéine), il est démontré que l'ARNm provenant des exosomes est capable de coder des polypeptides pour la synthèse protéique. A partir des années 2010, le domaine de recherche des vésicules extracellulaires a connu une réelle explosion avec une augmentation exponentielle des publications (Fig. 1B). Le premier groupe dédié à la recherche sur les exosomes, l'ISEV a été créé en 2011, ce qui a permis d'élaborer des lignes directrices internationales (MISEV) [41]. Ces guidelines ont été établies en 2014 [42] puis mises à jour en 2018 [27] et 2023 [41].

1.2.2 Classification des vésicules extracellulaires

Les noms donnés aux vésicules extracellulaires ont varié au fil des années et différentes nomenclatures ont été utilisées. Il est cependant important d'appliquer une terminologie précise et claire. Par conséquent, les EVs sont classées en différents sous-types, en fonction de leur mode de formation, leur taille et leur densité [43]. Les corps apoptotiques (500-5000 nm) sont des capsules contenant des fragments cellulaires résultant de l'apoptose, aussi appelée mort cellulaire programmée. Les microvésicules (100-1000 nm ; 1,12-1,20 g/mL), quant à elles, sont générées par bourgeonnement de la membrane plasmique. Les plus petites vésicules, les exosomes (30-150 nm ; 1,10-1,14 g/mL) proviennent d'un processus préalable d'endocytose. Néanmoins, en raison du chevauchement des exosomes avec les petites microvésicules par leur taille et de leur densité similaire, les techniques d'isolation ne permettent pas de distinguer les deux sous-types [41]. Dans le cadre de ce mémoire, le terme « EVs » sera utilisé pour englober les exosomes et les plus petites microvésicules (<220 nm).

1.2.3 Biogénèse, sécrétion des vésicules extracellulaires

La biogénèse des exosomes commence par le bourgeonnement de vésicules intraluminales dans un endosome précoce, lui-même le résultat d'un bourgeonnement vers l'intérieur de la membrane plasmique (Fig 2). Après l'incorporation de ces vésicules dans sa lumière, l'endosome est appelé corps multivésiculaire (MVB). Ce phénomène peut être partiellement dépendant ou indépendant de la machinerie ESCRT, qui est composée d'environ 30 protéines

(VPS4, VTA1, ALIX, TSG101,..) assemblées en quatre complexes différents (ESCRT 0-III) [29, 44, 45]. Même si ces deux voies peuvent interagir entre elles ou agir en synergie, il est intéressant de noter que le mécanisme indépendant de l'ESCRT produirait des vésicules plus petites que celui du mécanisme dépendant [46].

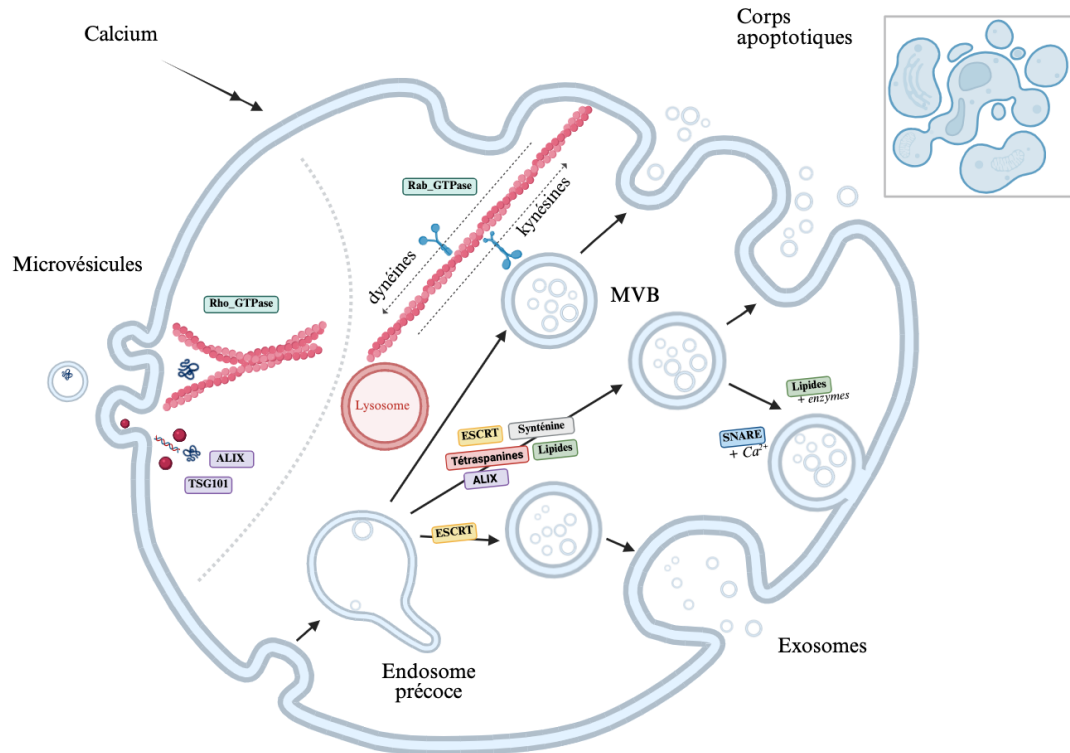


Fig. 2 – Biogénèse des vésicules extracellulaires : Corps apoptotiques ; microvésicules interagissant avec le cytosquelette d'actine ; exosome et voie endosomale dépendante et/ou indépendante du complexe ESCRT.

Concrètement, ESCRT-0 (TSG101 et HRS) est responsable du contenu exosomal en initiant le processus de chargement de protéines ubiquitinées. L'ubiquitination sert de signal pour la reconnaissance de la cargaison de protéines par ESCRT et facilite leur incorporation dans les MVB. ESCRT-I et ESCRT-II induisent une déformation de la membrane et le bourgeonnement interne, tandis que ESCRT-III permet la fusion et le détachement des vésicules à l'intérieur du MVB pour terminer leur formation. [29, 44]. Les voies indépendantes de ESCRT regroupent des interactions avec la synténine et ALIX. La protéine ALIX interagit à la fois avec un lipide membranaire et des protéines (le cytosquelette d'actine) en conservant une structure caractéristique en forme de banane. Elle peut ainsi générer ou soutenir une courbure négative au sein de la membrane dans le cadre du processus de bourgeonnement vers l'intérieur de l'endosome précoce [47, 48]. Cette initiation de la courbure de la

membrane peut également être prise en charge par les tétraspanines (CD9, CD63, CD81). L'induction de la déformation, de la fission et de la fusion membranaires semble possible grâce aux lipides spécifiques (céramides, acides phosphatidiques) et des enzymes modifiant ces lipides (ex : phospholipase D2). Le destin du MVB est soit de fusionner avec les lysosomes pour être dégradé, soit de migrer vers la membrane plasmique pour y libérer son contenu par l'exocytose [29]. Les conditions et les proportions prédisposant au sort du MVB sont largement inconnues, toutefois le niveau de pH et le niveau des lipides spécifiques (cholestérol et céramides) sembleraient être des éléments clés [49]. Le déplacement des corps multi-vésiculaires dans la cellule implique des éléments du cytosquelette : les kinésines et les dynéines pour les transporter respectivement de manière antérograde (vers la membrane plasmique), et de manière rétrograde (vers le lysosome) [50]. La famille des Rab GTPase (protéines essentielles pour la régulation du transport intracellulaire) se montre être impliquée dans ce transport également [51]. Le complexe SNARE calcium-dépendant semblerait piloter la fusion du MVB avec la membrane et la sécrétion d'exosomes [46, 52]. Bien que les exosomes soient l'un des sous-ensembles d'EVs les mieux caractérisés, beaucoup de mécanismes restent incompris.

Les microvésicules sont formées directement à partir de la membrane plasmique. Ce phénomène requiert une réorganisation physique au niveau membranaire : spécifiquement au niveau phospholipidique et au niveau de la dynamique du cytosquelette d'actine. En effet, la contraction de l'actomyosine est impliquée dans le bourgeonnement de la membrane plasmique. Une fois que les microvésicules sont chargées de cargaison et pincées par la contraction de l'acto-myosine, il est nécessaire de réguler le processus de bourgeonnement. Ces processus sont régulés par les Rho GTPases [53]. Les niveaux accrus de calcium affectent les phospholipides membranaires et améliorent la formation de microvésicules en augmentant le niveau de vésiculation [46]. De manière générale, autant pour les exosomes que pour les microvésicules, le calcium cytosolique est reconnu pour son impact sur le cytosquelette, lors de la formation et l'excrétion vésiculaire [54]. Bien qu'issus de processus distincts, ces deux sous-types de vésicules partagent certaines protéines telles que ALIX et TSG101 [46].

1.2.4 Contenu des vésicules extracellulaires

Une fois formées, les EVs sont caractérisées par un contenu riche en lipides, protéines et acides nucléiques. Elles sont composées de lipides avec leur bicouche phospholipidique enrichie en cholestérol, céramide, phosphatidylsérine et sphingomyéline ce qui permet la courbure de la membrane. Des preuves expérimentales suggèrent que les exosomes purifiés contiennent une quantité riche de sphingomyélinase ayant pour fonction la réorganisation des classes lipidiques (favorisant l'accumulation de céramides, modifiant les microdomaines ou radeaux lipidiques). Il semblerait également que l'inhibition de l'activité de la sphingomyélinase conduise à la réduction de la libération d'EVs par les cellules [46]. Le contenu protéique est composé de protéines membranaires telles que les tétraspanines (CD9, CD63, CD81,..) impliquées dans la biogénèse des EVs (voir point 1.2.3), des protéines composant l'ESCRT (ALIX, TSG101), et des protéines cytosoliques. Contrairement aux corps apoptotiques, il est plus rare de retrouver des éléments protéiques en provenance des organelles intracellulaires (noyau, golgi, réticulum endoplasmique, mitochondrie) dans les petites vésicules extracellulaires [27]. En résumé, ces différents composants sont régulièrement utilisés comme marqueurs confirmant la présence d'EVs dans un échantillon et la pureté de celui-ci. Le matériel génétique contenu au sein des EVs fait référence aux ARNm, au microARN et aux autres ARN non codants. Bien que le mécanisme de tri sélectif des microARN reste à déterminer pour savoir lesquels sont choisis pour l'encapsulation, il semble que plusieurs protéines de liaison aux microARN soient impliquées [55]. De même, le contenu transporté par les EVs peut indiquer le type cellulaire d'origine [29]. C'est le cas de muscle squelettique avec un enrichissement spécifique en miR-1 [56] ou en alpha-sarcoglycane [57]. En revanche, la capacité à discriminer le sous-type vésiculaire (exosome ou microvésicule) reste limitée par les caractéristiques physiques et par un enrichissement relativement semblable [58].

1.2.5 Interaction des vésicules extracellulaires avec les cellules réceptrices

Une fois que les vésicules se trouvent dans l'environnement extracellulaire, elles doivent atteindre une cellule réceptrice et interagir avec celle-ci [40].

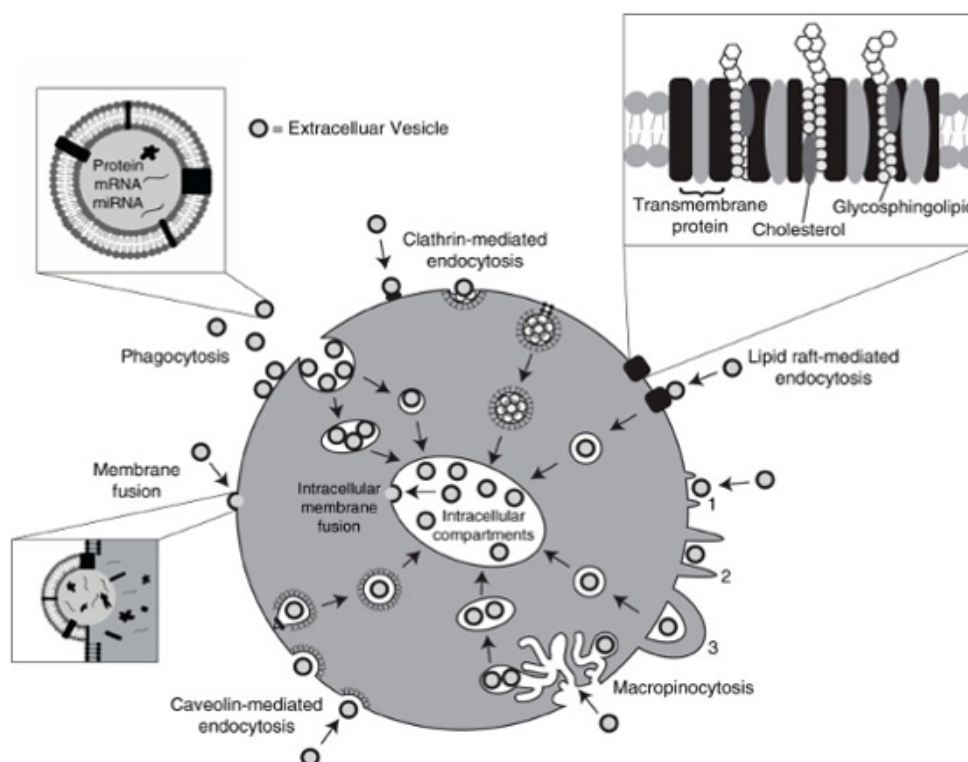


Fig. 3 – Voies d’absorption des vésicules extracellulaires par les cellules réceptrices; Figure provenant de Mulcahy 2014 [59].

Il existe plusieurs voies pour la captation des vésicules (Fig. 3) [59]:

- La fusion membranaire, impliquant une interaction directe avec la membrane plasmique, est la plus courante [60].
- La phagocytose, qui signifie ‘manger les cellules’ en grec [61].
- La macropinocytose, par l’intermédiaire de petites protubérances, s’étend et engloutit une partie du liquide extracellulaire [62].
- L’endocytose qui peut-être médiée par la clathrine ou la cavéoline grâce auxquelles elles vont être acheminées vers le cytosol [61].
- L’endocytose peut également être facilitée grâce aux radeaux lipidiques formés par les lipides membranaires [59].

De manière générale, une série d’interactions entre les composants des membranes des EVs et de la membrane cellulaire (tétraspanine, protéoglycane, immunoglobulines et intégrines), tels que l’intégrine CD11a et l’ICAM-1, peuvent favoriser l’absorption [59], mais ces mécanismes sont encore mal compris. D’ailleurs, cette particularité des EVs de présenter un antigène démontre leur possible spécificité à une destination, un type cellulaire [63, 64]. Cette seule interaction ligand-récepteur peut suffire pour induire un signal activant une cascade

de signalisations et la transcription d'un gène [65]. En cas de captation, le destin des EVs à l'intérieur de la cellule réceptrice est encore largement mal compris.

1.2.6 Fonctions des vésicules extracellulaires

La fonction des EVs est avant tout physiologique, permettant une communication inter-cellulaire paracrine et endocrine. Les EVs participent activement à la régulation de nombreux processus. Elles sont impliquées dans le maintien de l'homéostasie cellulaire, dans la modulation des réponses immunitaires, dans la régénération tissulaire, ainsi que dans la coordination des réponses inflammatoires ou métaboliques [66]. Par exemple, leur transport de molécules permet d'induire des modifications fonctionnelles durables dans les cellules cibles, favorisant ainsi l'adaptation des tissus à divers stimuli physiologiques.

Les études sur les vésicules extracellulaires se sont récemment intéressées à leur aspect pathologique dans le cadre du cancer par exemple. En effet, les vésicules extracellulaires d'une cellule tumorale peuvent empêcher sa détection par le système immunitaire, lui permettant ainsi d'échapper à la surveillance immunitaire, et de conférer son caractère malin à une autre cellule [67]. Ces vésicules peuvent également favoriser le développement de nouveaux vaisseaux sanguins [68], qui permettent d'augmenter l'apport d'oxygène et de nutriments à la tumeur. Aujourd'hui, les EVs sont utilisées comme biomarqueurs pour détecter les maladies à un stade précoce à partir d'un échantillon sanguin. L'une des perspectives d'utilisation des EVs est de surmonter une des principales difficultés de la pratique clinique qui est d'administrer un médicament aux cellules cibles. C'est pourquoi les EVs pourraient être utilisées à l'avenir comme application thérapeutique, leur biocompatibilité et leur biodégradabilité élevées leur conférant un avantage considérable par rapport aux autres nanoparticules synthétiques [69]. En dehors de ce cadre exclusivement clinique et pathologique, les fonctions physiologiques de ces EVs contribuant directement aux réponses homéostatiques ont sans aucun doute un rôle à jouer dans la réponse systémique à l'exercice physique et son rôle protecteur.

1.3 Exercice physique et vésicules extracellulaires

1.3.1 Effet de l'exercice sur les vésicules extracellulaires

Il a été démontré que l'exercice physique augmente la concentration des vésicules extracellulaires (EVs) dans la circulation. En 2015, Frühbeis a publié une étude pionnière [70] : lors d'un exercice à intensité progressivement croissante, les niveaux de petites EVs, mesurés par analyse de nanoparticules (NTA), augmentent puis diminuent à l'arrêt de l'effort. Cette augmentation a été confirmée par des marqueurs protéiques (Flot1, HSP/HSC70 et TSG101), dont les niveaux sont multipliés 5,2 fois après l'exercice. De même, à la suite d'un exercice de 60 min (30 min à 55 %, 20 min à 70 % et 10 min à 80 % de la VO_{2max}), les protéines vésiculaires, ainsi que la NTA, révèlent une augmentation significative [71]. Une autre étude montre qu'une intensité modérée seule (20 min à 70 % de la VO_{2max}) est suffisante pour élever le nombre d'EVs [72].

De manière intéressante, l'intensité requise pour observer cette augmentation semble apparaître juste avant le seuil lactique, défini ici par une augmentation de 1 mmol/L au-dessus de la valeur de base pour le cyclisme, et de 1,5 mmol/L pour la course à pied [70].

D'après les mesures réalisées à faible intensité par Warnier (60 min à 55 % de la VO_{2max}), la quantité d'EVs est multipliée par trois après 30 min d'effort, avant de diminuer de 58 % après les 30 dernières [73]. Cette analyse NTA, est affinée au western blotting montrant par l'augmentation des marqueurs vésiculaires (TSG101, CD81, HSP60) après 30 et 60 minutes. D'un autre côté, d'autres travaux (mesurés à la NTA) ont mis en évidence soit une absence d'augmentation (40 min à 55 % de la VO_{2max}) [74], soit une diminution des EVs circulants par rapport au niveau basal après un exercice à basse intensité (30 min à 60 % de la VO_{2max}) [75]. Toutefois, les observations de Warnier concordent avec une augmentation de l'enrichissement protéique des vésicules [27] qui semble plus fiable car elle est moins encline aux interférences avec les particules non-vésiculaires [41].

Il est intéressant aussi de noter que certains stimuli, tels que l'hypoxie, pourraient atténuer les réponses aiguës des EVs [73].

La taille des EVs rapporté à l'exercice se situe entre 50 et 120nm. Des données suggèrent que des EVs plus grandes pourraient être libérées à la suite de microlésions musculaires induites par l'exercice excentrique [76].

Outre des changements de quantité et de morphologie, le contenu des EVs est modifié en réponse à l'exercice, avec des altérations observées au niveau des protéines [71] et au niveau des microARN [77]. Le groupe de Mark Febbraio a notamment rapporté des augmentations particulières de certaines protéines, en particulier une élévation marquée des protéines liées à la glycolyse, ainsi que de la signalisation des protéines G et des GTPases [71].

1.3.1.1 Effet du type de population

Les effets présentés dans la section précédente peuvent varier selon les populations observées. Tout d'abord, la libération de EVs post-exercice est significativement plus élevée chez les sujets de poids normal que chez les sujets obèses [78]. Hors exercice, dans le contexte de l'obésité et du diabète de type 2, les niveaux d'EVs circulants basaux sont plus élevés que chez des individus en bonne santé [79] indiquant probablement le rôle pathologique. Chez ces mêmes sujets, une séance d'exercice à intensité modérée (70 % de la VO_{2max} pour une dépense de 400 kcal) permet de réduire les concentrations basales d'EVs à jeun, mais aussi de potentialiser l'effet de l'insuline [79].

Des différences entre les sexes ont également été mises en évidence : la libération de microvésicules après l'exercice semble plus élevée chez les femmes que chez les hommes, alors que les niveaux d'exosomes seraient inférieurs chez les femmes [75]. Les recherches de Kargl montrent que le nombre total d'EVs augmente uniquement chez les hommes après exercice, tandis que les niveaux de microARN contenus dans les EVs sont 184 % plus élevés chez les femmes [80].

Concernant l'âge, chez les individus entraînés, la réponse des EVs semble relativement homogène entre les jeunes et les personnes âgées [76]. Cependant, des différences de contenu existent entre les EVs provenant d'individus jeunes et âgés [72]. En effet, des diminutions notables des niveaux de SIRT et de NAD^+ ont été observées chez les adultes plus âgés en réponse à l'exercice (20 min à 70 % de la VO_{2max}), comparativement aux jeunes [72].

1.3.1.2 Effet de l'entraînement

Alors que les effets d'un exercice unique sur le nombre et le contenu circulant en vésicules sont relativement bien décrits dans la littérature, les effets à long terme sont moins clairs. Selon Maggio, après deux mois d'entraînement (trois sessions par

semaine), aucune modification significative du nombre d'EVs circulantes n'a été observée entre les états pré- et post-entraînement. Une tendance à l'atténuation de la réponse a même été observée [74]. 6 semaines d'entraînement de sprint (deux sessions par semaine) semblent avoir une tendance statistique à l'augmentation des particules circulantes (+ 47%), non confirmée au western blotting [81]. Dans cette étude, l'hypoxie modifie le contenu en microARN des EVs sans affecter leur quantité circulante [81]. Les individus entraînés présentent des profils de EVs distincts caractérisés par une augmentation du contenu spécifique [72, 82]. Une étude de Darragh et ses collaborateurs a montré que l'abondance des petits EVs au repos ne diffère pas de manière significative entre des individus ayant des antécédents d'entraînement différents, ce qui suggère que la variation à travers les statuts d'entraînement est davantage portée sur le contenu que sur la quantité des EVs [83].

1.3.1.3 Mécanismes sous-jacents

Les signaux potentiels prônant une influence de l'exercice sur la biogénèse des EVs incluent les mouvements du calcium largement impliqués dans le transport vésiculaire, l'excitation-contraction (mouvement actine/myosine), la mécanotransduction, les hormones (par exemple le cortisol, les catécholamines), les radicaux libres, les équilibres acido-basiques, éventuellement certains métabolites [84]. Ces mêmes signaux et leur intensité semblent varier en fonction du type d'exercices (intensité/durée, intervalle/continu), des conditions dans lesquelles il est réalisé (l'état d'entraînement, l'environnement, nutrition) et d'autres facteurs intrinsèques à l'individu tels que le sexe, âge et le statut d'entraînement [85].

Parmi les sous-types cellulaires, les plaquettes, les leucocytes et les cellules endothéliales semblent être particulièrement impliqués ; cependant, l'absence de marqueurs spécifiques limite une identification précise [86]. Pour bien comprendre le rôle des EVs circulantes dans la diaphonie tissulaire induite par l'exercice, il est essentiel d'identifier leur origine cellulaire, de caractériser les sous-types d'EVs concernés et d'élucider leur phénotype moléculaire et leurs propriétés fonctionnelles.

1.3.2 Impact du muscle squelettique et de l'activité contractile sur les vésicules extracellulaires

Le muscle squelettique est le plus grand tissu du corps humain en terme de masse, et est doté d'une certaine plasticité. En plus de fournir le cadre structurel du mouvement, la contraction musculaire semble jouer un rôle important dans la communication intercellulaire. Depuis 2010, en plus de la sécrétion de myokines, la libération de vésicules extracellulaires par le muscle a été identifiée en réponse à l'exercice [87].

1.3.2.1 Études in vitro et ex vivo des EVs du muscle squelettique

Les lignées cellulaires comme la lignée murine C2C12 ou la culture de cellules primaires humaines sont souvent utilisées comme modèle du muscle squelettique. Des dynamiques similaires sont observées entre les cultures murines et humaines présentant des profils protéiques vésiculaires similaires [88].

Le Bihan a démontré une corrélation entre le temps d'incubation et la quantité de protéines sécrétées : environ 23 μg de protéines sont libérés après 72 heures d'incubation pour 1×10^6 cellules [89]. Toutefois, en réponse à un stress oxydatif (traitement au peroxyde d'hydrogène), les myoblastes humains entrent en sénescence prématurée, ce qui provoque une augmentation de la libération d'EVs par un facteur cinq par rapport aux contrôles non traités [90]. De manière contradictoire, Davies a observé que la sénescence liée à l'âge induit une diminution significative du nombre de ces vésicules extracellulaires musculaires (SkM-EVs) par rapport aux cellules témoins [91], cette fois-ci dans le cas d'une sénescence naturelle.

Les SkM-EVs véhiculent notamment de l'ADN mitochondrial ainsi que plusieurs protéines mitochondriales spécifiques, telles que la malate déshydrogénase, la protéine de choc thermique de 75 kDa, l'adénylate kinase et la superoxyde dismutase 2 [86]. En contexte de sénescence, une modification du contenu est observée : les SkM-EVs sénescents présentent un rapport lipides/protéines significativement augmenté par rapport aux EVs témoins [91]. Ce phénomène rejoint les observations dans les cultures humaines primaires, où Fernandez-Rhodes rapporte un rapport lipides/protéines plus élevé dans les SkM-EVs provenant de donneurs âgés [92].

Une autre approche pour collecter SkM-EVs consiste à incuber des fragments de muscle ex vivo dans du milieu de culture. Cette méthode est basée sur le fait que les SkM-EVs s'accumulent principalement dans l'interstitium du muscle squelettique, plutôt que d'être sécrétées dans la circulation sanguine [88].

Le tissu musculaire présente une capacité de sécrétion d'EVs supérieure à celle du tissu adipeux, lorsqu'elle est rapportée à la masse [93]. Ajoutons que cette sécrétion est modulée par l'état physiologique : elle augmente après l'exercice physique, mais diminue en situation de dystrophie musculaire [94]. De même Huang confirme que lors de l'atrophie musculaire, le nombre de SkM-EVs libérées par gramme de muscle et par heure est significativement réduit [95].

La typologie musculaire influence également la quantité d'EVs sécrétées. Ainsi, le muscle soléaire, riche en fibres oxydatives, libère davantage d'EVs par unité de masse que le muscle plantaris, à dominante glycolytique [93]. Les vésicules issues du soléaire présentent en outre un diamètre moyen et modal inférieur à celles produites par le plantaris, indiquant des caractéristiques physiques distinctes selon le type de fibre. Le muscle oxydatif exprime en effet des niveaux cinq fois plus élevés d'ALIX et quatre fois plus élevés de TSG101 que le muscle glycolytique [96].

Enfin, concernant le rôle potentiel de la contraction musculaire dans la libération des SkM-EVs, l'inhibition pharmacologique par la blebbistatine n'a pas diminué la quantité d'EVs sécrétées. Elle a cependant réduit le diamètre moyen des vésicules, sans altérer leur diamètre modal [93], indiquant que la contraction n'est peut-être pas un facteur central de la sécrétion.

In vivo, dans la circulation sanguine, la détection des SkM-EVs est plus délicate à cause d'un manque de marqueur spécifique. L'utilisation de la méthode d'isolation par immuno-billes ciblant l'alpha-sarcoglycane a permis de récupérer environ 2 à 5% de la quantité totale d'EVs présentes dans le plasma[57], soulignant la faible représentation relative des SkM-EVs.

Concernant l'effet de l'exercice physique, Rigamonti a observé une augmentation de la concentration en EVs alpha-sarcoglycane positifs dans le plasma après l'effort [75]. Plus récemment, Maggio a confirmé cette augmentation spécifique des EVs d'origine musculaire dans la circulation sanguine après l'exercice [74].

1.3.2.2 Stimulation électrique des myotubes in vitro

L'utilisation du modèle de stimulation électrique in-vitro (EPS) est intéressante pour observer l'effet de la contraction musculaire. La difficulté de cette manipulation réside dans la capacité à réellement voir les myotubes se contracter. Une stimulation électrique aiguë courte (1 h, 14 V, 1 Hz) n'a pas modifié la quantité d'EVs produites [97]. De manière similaire, aucune augmentation du nombre total d'EVs n'avait été observée chez Nie (sans description du protocole) [96].

En revanche, une stimulation prolongée a montré des effets notables. Après 24 heures d'exposition à 1 Hz, les concentrations d'EVs augmentaient de 1.26 fois, et de 1.77 fois dans un protocole d'alternance de fréquences (30 Hz pendant 1 seconde, puis 0 Hz pendant 29 secondes) [98]. Une augmentation du contenu spécifique en microARNs a été observée : le miR-206-3p, impliqué dans la fonction cognitive, et le miR-486a-5p, associé à des effets cardioprotecteurs.

De plus, un protocole de contraction chronique (EPS de 3 heures par jour pendant 4 jours à 14 V et 1 Hz) a conduit à une élévation progressive du rendement en protéines vésiculaires totales, accompagnée d'une surexpression de marqueurs classiques d'EVs : CD81 (+1.4x), TSG101 (+1.2x) et HSP70 [99]. Ces quatre études ont évalué les effets de l'EPS sur les myotubes C2C12.

1.3.2.3 Effet fonctionnel in vitro des vésicules extracellulaires provenant du muscle squelettique

L'effet fonctionnel des SkM-EV a été testé sur divers types cellulaires en culture et a montré plusieurs effets bénéfiques. Sur les cellules nerveuses, les SkM-EVs augmentent la longueur moyenne des neurites par neurone, améliorent l'indice de complexité des neurites (nombre de branches par neurite) et accroissent la taille moyenne des cellules neuronales [100]. Ils stimulent la myogenèse des cellules souches dérivées du tissu adipeux humain [101]. Sur les cellules endothéliales, les SkM-EVs augmentent la prolifération (20 %), la migration (23 %), et stimulent la formation de structures vasculaires [96]. De manière additionnelle, la surexpression de PGC-1 α dans le muscle squelettique favorise la sécrétion de SkM-EVs capables d'amplifier les marqueurs d'angiogenèse et de protéger les cellules contre le stress oxydatif aigu in vitro [102]. À l'inverse, le traitement de cellules endothéliales avec

des EVs provenant de myoblastes soumis à un stress oxydatif augmente les marqueurs de sénescence et réduit la prolifération [90].

Sur la réponse immunitaire, l'exposition de macrophages RAW264.7 à des EVs issues de myoblastes traités au peroxyde d'hydrogène induit une surexpression d'IL-6, une cytokine pro-inflammatoire [103].

Finalement, les SkM-EVs régulent aussi la différenciation des cellules osseuses : Les gènes spécifiques aux ostéoclastes (cathepsine K, NFATc1, CTR, Mmp9) sont fortement réprimés dans les monocytes exposés aux SkM-EVs [95]. De plus, les SkM-EVs améliorent la formation osseuse en stimulant l'expression de marqueurs tels que OCN (ostéocalcine) et COL-1 (collagène de type I) [94]. Toutefois, les SkM-EVs issues de muscles atrophiés perdent une partie de cette capacité à soutenir l'ostéogenèse [95].

A travers ces différents exemples, les vésicules extracellulaires provenant du muscle squelettique semblent avoir une importance fonctionnelle sur différents tissus.

1.3.3 Enzymes antioxydantes

Le muscle squelettique est étroitement lié au système anti-oxydant, car il est une source majeure de radicaux libres lors de l'activité physique [104]. Le stress oxydatif correspond à un déséquilibre entre oxydant et anti-oxydant. Pour se protéger contre les dommages oxydatifs, le muscle s'adapte en augmentant la production d'enzymes antioxydantes. En effet, les mitochondries sont la principale source de ROS dans les cellules, surtout lors d'une activité métabolique élevée ou de dysfonctionnements de la chaîne respiratoire [105]. Le déséquilibre des facteurs pro-oxydants/antioxydants joue un rôle majeur dans l'apparition et la progression de maladies [7]. Face à une élévation de la production de ROS, les cellules augmentent l'activité des enzymes antioxydantes. L'efficacité de cette défense dépend de la disponibilité de cofacteurs réducteurs comme le NADPH, essentiel pour le fonctionnement des systèmes antioxydants et dépend aussi de NRF2 qui grâce à sa translocation nucléaire régule l'expression des enzymes antioxydantes [106]. Récemment, le statut redox de la cargaison des EVs en circulation produit à l'exercice a été interrogé. Il est avancé que les EVs libérés lors de l'exercice ont un potentiel antioxydant augmenté [107]. Les sujets entraînés pourraient améliorer l'homéostasie redox via les vésicules extracellulaires circulantes [108]. Cinq jours

consécutifs d'entraînement (30 minutes à 70% de la fréquence cardiaque max) chez des sujets non entraînés a permis l'augmentation des protéines antioxydantes catalase et SOD2 au sein des EVs [108].

La dernière étude investiguant le protéome des EVs dans le laboratoire [78] a montré une augmentation notable de peroxyrédoxines (PRDX) après exercice aigu (30 minutes à 60%VO₂peak) et chronique (3x/semaine durant 12 semaines), encapsulées dans les vésicules extracellulaires circulantes. Au vu des données avancées sur le muscle squelettique dans cette introduction, nous posons l'hypothèse que le contenu antioxydant des vésicules extracellulaires pourrait provenir des muscles à l'exercice.

2 OBJECTIFS DU TRAVAIL

Deux objectifs distincts ont été fixés dans le cadre de ce mémoire :

- (1) L'optimisation d'un protocole d'isolation de vésicules extracellulaires à partir de milieu de culture cellulaire de myotubes humains.
- (2) L'évaluation de l'effet d'un protocole de stimulation électrique sur la libération de vésicules extracellulaires par des myotubes humains et leur contenu antioxydant.

3 MÉTHODES

3.1 Protocole expérimental

Afin de mieux comprendre les spécificités du muscle squelettique, une approche in vitro par culture cellulaire a été choisie. Le présent travail s'est fait en deux phases distinctes. La première phase a consisté en l'optimisation des conditions de culture cellulaire et de l'isolation des vésicules extracellulaires (Fig. 4).

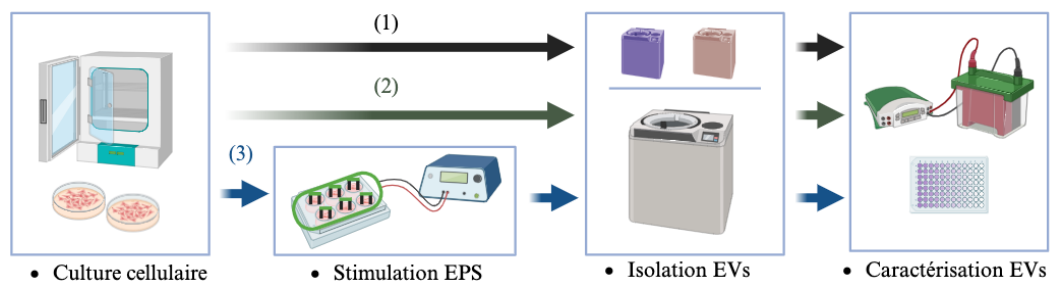


Fig. 4 – Protocole expérimental en 3 parties : Culture cellulaire et électrostimulation ; Isolation des vésicules extracellulaires à partir du milieu de culture par ultracentrifugation différentielle et comparaison de 2 rotors ; Caractérisation via western blotting et normalisation par concentration protéique.

Dans cette première phase, 2 expériences ont été menées :

- (1) Comparaison entre 2 rotors (voir point 3.4) avec des protocoles d'ultracentrifugation équivalents sur le culottage des vésicules des milieux de culture en prolifération et en différenciation : validation et optimisation de la méthode.
- (2) Confirmation de l'enrichissement en EVs dans la dernière fraction isolée par présence de marqueurs vésiculaires et de la pureté par l'absence de marqueurs intracellulaires.

La seconde phase a consisté en l'analyse du contenu antioxydant des vésicules libérées par les myotubes humains en réponse à un protocole d'électrostimulation. Dans cette optique une troisième expérience a été menée (Fig. 4) :

- (3) Stimulation de 24h des myotubes humains différenciés et ensuite caractérisation de leur contenu en peroxyrédoxines. L'expérience a été répétée 5 fois (nombre de réplica utilisé sur d'autres études similaires [97, 99]) avec pour chacune des stimulations une boîte contrôle cultivée dans les mêmes conditions. Elles ont été nommées de C1-C5.

3.2 Culture de cellules musculaires primaires humaines

Principe :

La culture cellulaire de 'myotubes primaires' est un modèle ex vivo obtenu à partir d'une biopsie musculaire dont une petite partie de l'échantillon est mise en culture. Les cellules satellites, mononuclées, sont capables de proliférer, de se différencier et de fusionner pour former des myotubes polynuclées [109]. Ces myotubes conservent certaines caractéristiques génétiques et épigénétiques du muscle d'origine, notamment la fonction mitochondriale [110]. Pour ces raisons, il s'agit d'un modèle intéressant pour étudier le métabolisme au sein du muscle squelettique. Cependant, contrairement aux lignées cellulaires, au fur et à mesure des passages, les fonctions cellulaires des myotubes peuvent être altérées, notamment leur capacité de prolifération, de fusion, de différenciation et leur métabolisme (captation de glucose, oxydation des substrats énergétiques) [111].

Le milieu de prolifération est plus concentré en FBS contenant des facteurs qui maintiennent les cellules dans un état prolifératif (IGF, EGF, FGF), et empêchent la différenciation. Le processus de différenciation des cellules satellites en myotubes est induit par le changement de milieu favorisant l'arrêt de la prolifération

et l'activation du programme myogénique grâce aux facteurs MRFs (Myogenic Regulatory Factors) et des cofacteurs comme MEF2 [112].

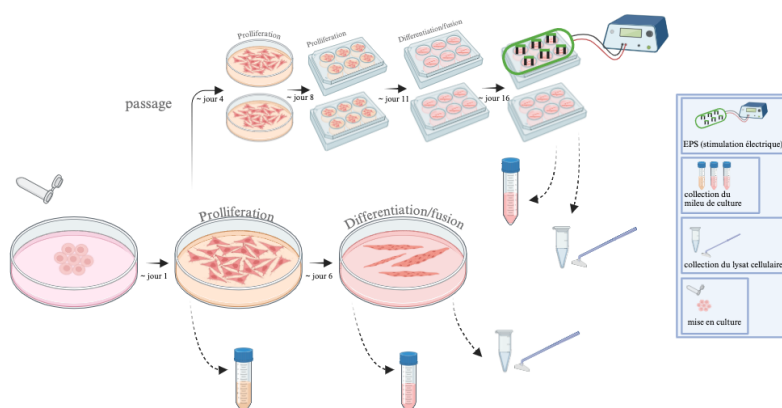


Fig. 5 – Culture cellulaire : Mise en place de la culture cellulaire, passage, prolifération, différenciation et stimulation.

Protocole :

Dans le cadre de ce travail, l'isolation des cellules satellites primaires avait été réalisée précédemment, et celles-ci avaient été libérées par digestion enzymatique à la collagénase à partir d'une biopsie du vaste latéral du quadriceps chez 3 donneurs mâles sains. Les cellules ont ensuite été purifiées par centrifugation sur gradient de densité et sélectionnées par adhérence différentielle. Les cellules satellites purifiées ont été congelées -80°C dans du sérum de veau fœtal (FBS) contenant 10% de diméthylsulfoxyde (DMSO). Seuls les premiers passages (P3-P4) ont été utilisés dans cette étude. Les cellules ont été mises en culture dans des boîtes de Petri de 100 mm dans 10 mL de milieu de prolifération composé de DMEM (5.5 mM glucose) supplémenté avec pénicilline/streptomycine, amphotéricine, 0.5% d'Ultroser G, 2% d'HEPES (10 mM, pH 7.0) et 20% de FBS déplété en vésicules, à 37°C, 5% de CO₂ et une humidité constante. Ces boîtes sont divisées en 2 de manière à obtenir une boîte contrôle puis passée dans des boîtes de 6 puits (Fig. 5). Afin d'étudier les EVs, il est nécessaire d'éliminer les vésicules présentes dans le sérum de culture [113] et de réenrichir le milieu ensuite (ex : HEPES ou UltroserG) [114]. Le sérum de culture a donc été ultracentrifugé pour obtenir un sérum sans vésicule (18 h, 100 000 g, 4°C) et filtré (0.2 µm). Lorsque les cellules ont atteint une confluence de 80-90%, généralement environ après quelques jours, un passage a été effectué pour permettre l'obtention d'une boîte contrôle, puis elles sont passées une seconde fois vers des boîtes de 6 puits (30 mm,

2 mL de milieu) pour la stimulation. Les cellules ont été comptées lors du passage à l'aide d'une chambre de Neubauer après trypsinisation où un aliquot de 20 μ L a été déposé entre lame et lamelle. Les cellules ont été comptées manuellement dans les quadrants définis de la grille pour calculer la concentration cellulaire. Lorsque les cellules ont atteint une confluence de 90-100%, un milieu de différenciation a été ajouté : DMEM 5.5 mM contenant pénicilline/streptomycine, amphotéricine, 1% d'HEPES et 2% de FBS déplété en vésicules. Le milieu a été changé strictement tous les 2 jours et 24 heures après la mise en culture, car le DMSO présent pour la conservation est toxique pour les cellules. Au jour 5 (prolifération et différenciation), le milieu (~20 mL) incubé pendant 48 heures a été collecté et conservé à -20°C. Dans le cas de stimulation, le milieu a été collecté directement après la fin des 24h de stimulation, ensuite les cellules ont été collectées. Des images ont été prises quotidiennement afin de suivre l'évolution de la culture cellulaire. L'indice de prolifération a été calculé sur la base de l'évolution du nombre de cellules, comptées manuellement sur trois jours sur une moyenne 3 images par jour et par boîte. L'indice de différenciation a été évalué sur la même période, en mesurant la largeur des myotubes (moyenne de 3 myotubes sur 3 images par boîte) à l'aide de l'outil "Straight Line" du logiciel Fiji.

3.3 Stimulation électrique par impulsion

Principe :

La stimulation électrique a pour objectif de mimer in vitro la dépolarisation membranaire et de permettre une contraction des myotubes. Le protocole EPS peut être ajusté pour moduler le type d'exercice (continu ou intervalles) et les variables (intensité V, durée, fréquence Hz) [115, 116]. Cet ajustement est crucial pour déterminer l'activation soit de la voie de l'AMPK (basse fréquence <5Hz) ou de la phosphorylation of p70S6K (haute fréquence >30Hz) relative aux adaptations à un exercice d'endurance [117] ou de musculation [118]. Bien qu'il ne sera jamais purement représentatif, le challenge est de choisir un protocole adéquat permettant de mimer un exercice in-vitro.

Protocole :

Avant de commencer la stimulation, les myotubes différenciés, préalablement lavés au PBS (la composition est disponible en annexe), sont laissés dans 3 mL (par puits)

de milieu sans sérum pendant 1h. Les électrodes (C-Dish ; IonOptix), sont placées dans le milieu et connectées au générateur (C-Pace EP ; IonOptix). Les cellules contrôles ont été traitées de la même manière, sans placer les électrodes. Les cellules ont été stimulées à basse fréquence [1 Hz], 2 ms, à une intensité de 10 V pendant 24 heures, sur base d'un protocole établi dans la littérature [116, 117]. Les milieux de culture ont été collectés pour isolation.

3.4 Isolation des vésicules extracellulaires par centrifugation différentielle et ultracentrifugation

Principe :

L'ultracentrifugation différentielle est utilisée pour séparer dans un fluide hétérogène des particules de tailles et de densités différentes. Le principe fondamental de la centrifugation vient des lois du mouvement de Newton, notamment l'inertie. Les particules subissent une force centrifuge partant du centre de rotation vers l'extérieur, proportionnelle à leur masse et à la vitesse angulaire du rotor [119]. De cette manière, les particules peuvent être isolées par des centrifugations successives, les plus grosses particules se dirigeant en premier vers le fond du tube et les plus petites en dernier. Cela permet typiquement de séparer les différentes

sous-populations de vésicules. Les rotors utilisés dans ce projet sont des rotors à angles fixes car ils permettent un meilleur culottage [119]. Le K facteur, indirectement proportionnel à l'efficacité de sédimentation, est une information importante variant principalement en fonction du rayon et de l'inclinaison du rotor. La viscosité du milieu peut aussi affecter le culottage, par exemple, il y aura une meilleure précipitation dans le PBS que dans le milieu de culture [120].

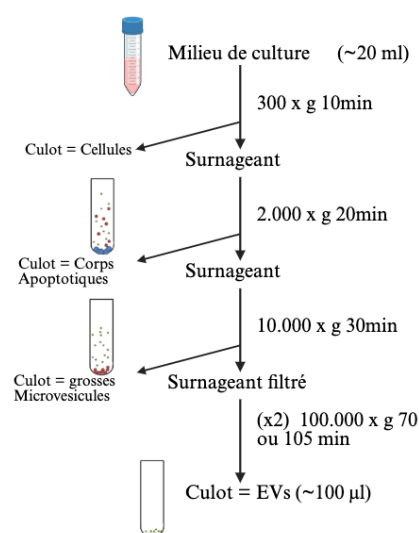


Fig. 6 – Ultracentrifugation différentielle : Centrifugation successive et collection du surnageant pour la centrifugation suivante jusqu'à la collection des vésicules extracellulaires se situant généralement dans une fourchette de taille de 30 à 250 nm.

Protocole :

Comme le montre la figure 6, le protocole d'isolation des EVs à partir du milieu de culture choisi correspond au protocole écrit par Clotilde Thery [114]. Premièrement, le milieu fraîchement collecté est centrifugé à 300 x g pendant 10 min pour éliminer les cellules mortes (*Thermo scientific IEC CL10 ; rotor O-G26*). Ensuite, le surnageant est centrifugé successivement 20 min à 2000 x g pour éliminer les débris ainsi que les corps apoptotiques et 30 min à 10 000 x g pour éliminer les plus grosses microvésicules (*Eppendorf Centrifuge 5430 R ; rotor FA-45-16-17 ; tubes Eppendorf 0030 119.401*). A la suite, le surnageant est collecté en utilisant une seringue (*Temuro SS+20LI*) et une aiguille, puis filtré 0.22 µm (filtre *Millex MF-Millipore SLGSR33SS*) pour être transféré dans les tubes de l'ultracentrifugeuse dans laquelle le filtrat est ultracentrifugé 2 fois à 100 000 g 4°C. Le culot final est suspendu dans 100 µL de PBS, vortexé et dissout 20 min sur agitateur. Les échantillons sont préparés (laemli) avant d'être conservés au -80°C. Deux ultracentrifugeuses ont été comparées: *LE-80K ; rotor 70 Ti , K factor = 44 ; tubes Beckman Coulter 355618* (Fig. 7). Dans cette première, 1 mL de culot est laissé après la premier ultracentrifugation et du PBS est ajouté pour un volume de 20 mL avant la deuxième ultracentrifugation. Avec la deuxième ultracentrifugeuse : *Optima XP max ; rotor TLA-55, K factor = 66 ; tubes BEC-357448*, la force et les volumes totaux de milieu ont été conservés. En revanche, la durée de centrifugation a été recalculée pour obtenir l'équivalent de 105 min : $\frac{T_1}{K_1} = \frac{T_2}{K_2}$ [119] ; $T_2 = \frac{70 \times 66}{44} = 105$. Pour cette centrifugeuse, le filtrat a été redistribué dans 12 tubes de 1.5 mL, et suite à la première ultracentrifugation, les 12 culots (75 µL) sont vortexés et rassemblés pour être centrifugés une seconde fois. 500 µL de PBS est ajouté pour remplir le tube. Le culot est souvent visible après la seconde ultracentrifugation.

a)

	Rotor	K-factor	Rayon (mm)	Volume tube (ml)	Volume rotor (ml)	Temps de centrifugation (h)	RPM pour 100,000 × g
LE-80K (Beckman)	70 Ti	44	r_min: 39.5 r_avg: 65.7 r_max: 91.9	22	180	70 min	$\sqrt{(100000 / 65.7 \times 1.12)} \times 1000 \approx 36\,802 \text{ rpm}$
Optima XP max (Beckman)	TLA-55	66	r_min: 25 r_avg: 40 r_max: 55	1.5	15	$(70 / 44) \times 66 = 105 \text{ min}$	$\sqrt{(100000 / 40 \times 1.12)} \times 1000 \approx 47\,245 \text{ rpm}$

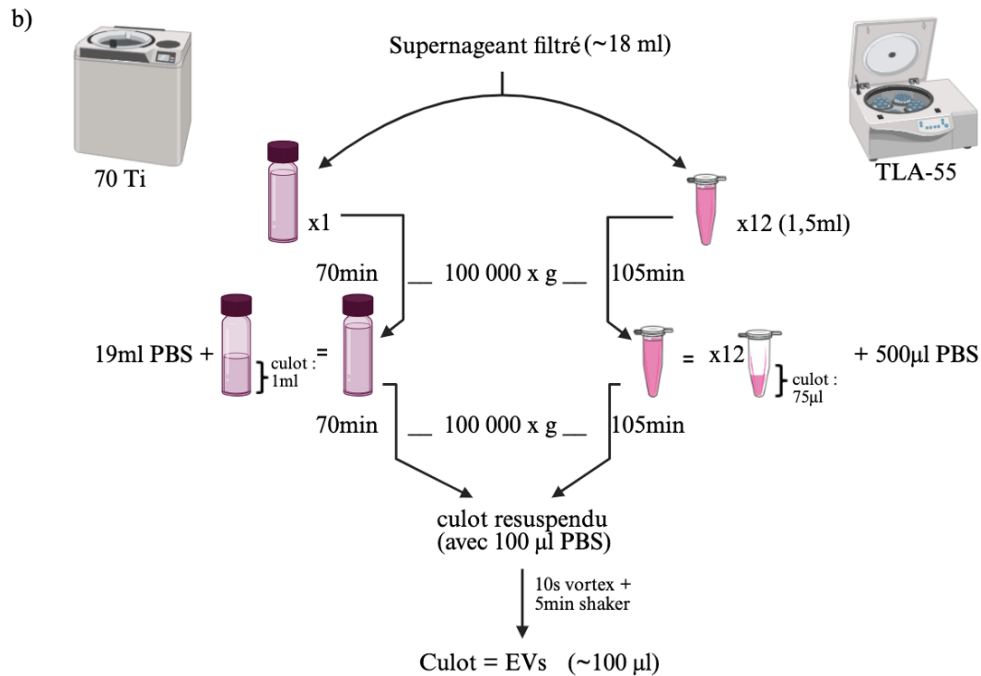


Fig. 7 – Caractéristiques des ultracentrifugeuses et protocoles associés ; a) fiche technique des rotors 70 Ti et TLA-55, b) description des protocoles d’isolation des vésicules extracellulaires depuis le milieu de culture.

3.5 Extraction protéique

Directement après la collection du milieu suite à la stimulation, les myotubes sont rincés au PBS et 75µl de tampon d’extraction sont ajoutés dans chaque puits pour l’extraction. Les cellules sont collectées en grattant le fond de la boîte avec une scrapette puis transférées dans des microtubes et stockées à -80°C (suite aux points 3.6 et 3.7).

3.6 Dosage protéique

Le contenu en protéines des lysats cellulaires est mesuré par la méthode de Lowry à l’aide du kit Bio-Rad DC protein assay. Cette méthode est basée sur la réaction du biuret, la formation d’un complexe coloré bleu des ions de cuivre (Cu²⁺) avec les liens peptidiques des protéines dans un milieu alcalin (pH >7) [121]. Une

gamme étalon est réalisée (0; 0.4; 0.8; 1.2; 1.6; 2 mg/mL) à partir d'une concentration d'albumine connue provenant de la bovin sérum albumine (BSA). Chaque dilution et chaque échantillon est déposé en triplicat dans les puits d'une microplaque transparente. Conformément au kit, des réactifs sont ajoutés aux échantillons : le réactif A mélangé au réactif S (25 µL/puits) est un complexe qui comprend le cuivre, le réactif B (200 µL/puits) est un réactif Folin. Il vient améliorer la sensibilité en oxydant des acides aminés et en donnant une couleur bleue. Un spectrophotomètre mesure à 655 nm l'absorbance de la réaction de Biuret après incubation (~10min). Sur base des résultats, une droite d'étalonnage peut être tracée et nous permet de déterminer la concentration protéique de notre échantillon. Cette droite possède un coefficient de détermination (R^2) ce dernier doit être supérieur à 0.98 pour considérer que le processus méthodologique est validé.

3.7 Western blotting

Principe :

Le western blotting est une technique à faible débit permettant de détecter une protéine spécifique dans un échantillon. [122] Tout d'abord, les protéines sont dénaturées à partir d'un échantillon grâce au 2-Mercaptoéthanol (Laemmli buffer : voir annexe). Ensuite, ces protéines sont séparées en fonction de leur poids moléculaire à l'aide d'une électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Une fois les protéines séparées, elles sont transférées sur une membrane, cela permet la détection ultérieure de la protéine d'intérêt en utilisant des anticorps primaires spécifiques, suivis d'anticorps secondaires marqués permettant sa visualisation.

Protocole :

Le volume d'échantillons à prélever est calculé sur base de la concentration en protéines permettant d'évaluer l'enrichissement respectif des marqueurs choisis. Les concentrations des échantillons sont équilibrées en les diluant à du tampon d'extraction. Ensuite, du Laemmli (Tris 1 M, Glycerol 25%, SDS 25%, beta-mercaptoethanol 12%, bleu de bromophénol 0.01% (Sigma : B8026), pH 6.8) est ajouté pour 1/5e du volume total. La fraction EVs et les surnageants de ultracentrifugation sont quant à eux directement mixés au laemmli (32 µL + 8 µL). Les échantillons sont chauffés (5 min à 95°C) pour dénaturer les protéines et donc les linéariser. Les échantillons sont migrés sur des gels SDS-PAGE à 15% (voir

annexe). Après électrophorèse, les protéines ont été transférées sur des membranes en nitrocellulose PVDF, bloquées à température ambiante avec 5% de lait, puis incubées toute la nuit à 4°C en présence des anticorps : marqueurs des EVs (-Alix_E6P9B (92880), -TSG101 (Ab30871), -CD9_D3H4P (13403), -CD63 (sc-5275), -CD81_D3H4P (56039), -HSP60 (4870)) ; marqueurs contaminants du réticulum endoplasmique (Calnexin (2433)), de l'autophagosome (LC3B (SAB4200361)), mitochondriaux (TOM20 (42406)). Le signal a été détecté à l'aide d'un anticorps secondaire conjugué à la peroxydase de raifort (Immobilon Forte, Milipore) et révélé par le système de chimiluminescence (G-BOX, Syngene).

3.8 Statistiques

La normalité a été mesurée à l'aide du test Shapiro-Wilk et l'égalité de variance a été testée à l'aide du test de Levene. Les données ont été analysées à l'aide d'un test t de Student indépendant avec Jamovi (version 2.6.26, Jamovi). Lorsque l'hypothèse de l'égalité des variances Levene n'était pas satisfaite, un test t de Welch a été utilisé. Les points de données individuels sont représentés, avec la moyenne $\pm$ l'erreur standard moyenne (SEM), le cas échéant. Tous les graphiques ont été créés à l'aide du logiciel GraphPad-Prism (version 10.1.2, GraphPad, San Diego, CA, USA). Le seuil de significativité a été fixé à $p \leq 0.05$. Les p-valeurs et la taille de l'effet (cohen's d) du test t de Student/Welch pour les résultats sont indiquées. Une taille d'échantillon de $n = 5$ répliques a été utilisée pour l'expérience de stimulation. L'évolution de la culture cellulaire a été quantifiée avec le logiciel Fiji (version 2.14.0, Fiji/ImageJ).

4 RÉSULTATS

4.1 Homogénéité des paramètres myogéniques

Les cellules musculaires primaires mises en culture ont été isolées à partir d'une biopsie, dont les caractéristiques des donneurs sains se trouvent dans le tableau 1.

Tableau 1 - Caractéristiques de base de la culture

	Mesures	groupe CTRL	groupe EPS	p-valeur
Donneur :	Sexe	masculin		
	Age (année)	36 ± 12		
	taille (m)	1.76 ± 0.07		
	poids (kg)	78.96 ± 14.13		
	bmi (kg/m ²)	25.31 ± 2.15		
	VO2max (ml/min/kg)	42.21 ± 4.01		
Cellules :	Nombre de culture (n)	5	5	
	Neubauer (cellules/cm ²)	16527.78 ± 1335.79		
	passage (n°)	5 ± 1		
	indice de prolif. (%)	105 ± 14	93 ± 12	p=0.310
	indice de diff. (%)	39 ± 9	41 ± 10	p=0.747
	[protéine] (mg/ml)	0.479 ± 0.137	0.636 ± 0.144	p=0.116

Toutes les valeurs sont des moyennes ± SD

Lors du passage des cellules, celles-ci sont comptées avec la technique de Neubauer, pour une densité relativement haute de 16 500 cellules/cm², ce qui permettrait une meilleure différenciation/fusion [123]. L'absence de différences pour l'indice de prolifération (par comptage manuel sur 3 jours), l'indice de différenciation (calculé avec l'évolution de la largeur du myotube sur 3 jours) et la concentration protéique du lysat cellulaire démontre une homogénéité entre les groupes. La figure 8 illustre le développement cellulaire à différents moments des phases de prolifération et différenciation. (Fig. 8).

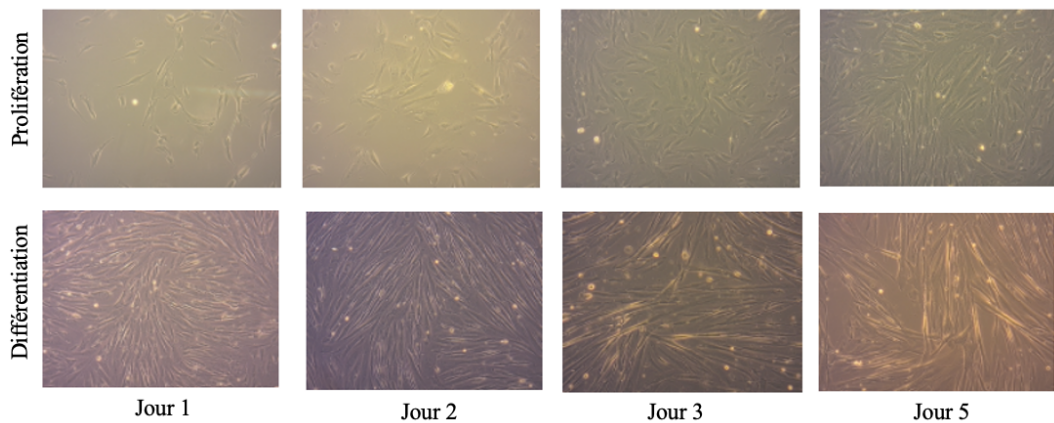


Fig. 8 – Images représentatives de l'évolution de la prolifération et différenciation myogéniques. Les images ont été prises à un grossissement de 10X.

4.2 Meilleure isolation des EVs avec le rotor TLA-55

Pour étudier l'influence de la centrifugeuse et du rotor sur le rendement et la pureté des EVs, nous avons analysé le milieu de culture incubé durant 48h et ce en

prolifération et différenciation. La caractérisation des EVs a été réalisée en détectant des protéines vésiculaires dans les SkM-EVs, notamment ALIX, TSG101 et CD9. Le contrôle cellulaire montre la réussite technique du western blotting.

Pour le rotor 70 Ti, à l'inverse de TSG101 qui n'est pas ressortie, ALIX et CD9 ont été marqués de manière minime pour les EVs provenant de la différenciation. En prolifération, seul un faible signal pour ALIX est présent.

Pour le rotor TLA-55, un signal clair et visible apparaît : les trois protéines étaient présentes dans les SkM-EVs (Figure 9a), confirmant une isolation réussie des petites vésicules extracellulaires à partir de cultures de cellules musculaires primaires humaines. Les surnageants provenant des ultracentrifugations ont aussi été testés, et n'ont pas révélé la présence de protéines (Figure 9b). L'isolation avec le rotor TLA-55 est plus efficace, avec une isolation relative des EVs par rapport au contrôle cellulaire nettement supérieur (Figure 9c et Figure 9d).

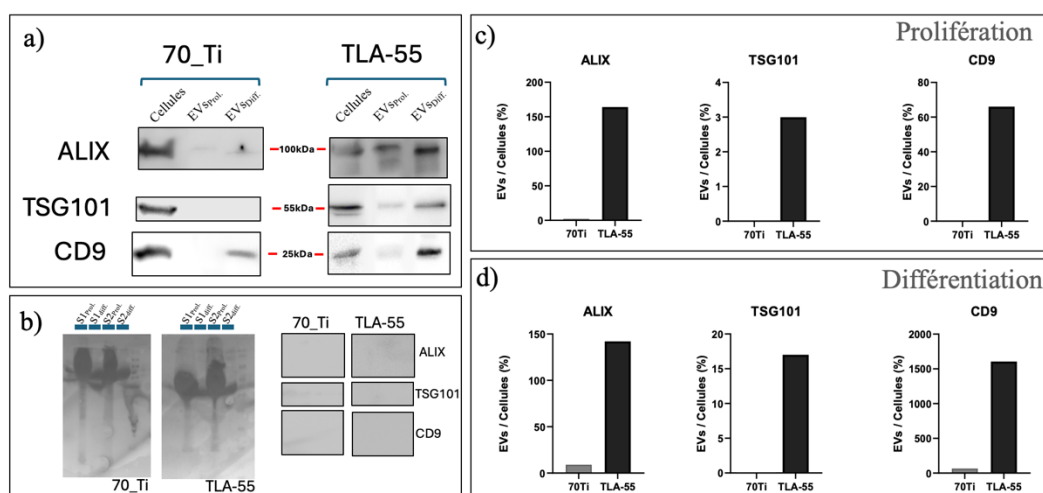


Fig. 9 – Comparaison des rotors d'ultracentrifugeuses Beckman 70Ti et TLA-55 : a) Bandes western blotting (ALIX, TSG101, CD9) ; b) Rouge ponceau et bandes western blotting des surnageants après première ultracentrifugation (S1) et deuxième (S2) dans les deux conditions : prolifération et différenciation ; c) Rapport des quantifications des marqueurs des vésicules extracellulaires (EVs) et cellules en prolifération ; d) Rapport des marqueurs des EVs et cellules en différenciation

4.3 Validation de la signature vésiculaire et de la pureté des EVs isolés

Conformément aux recommandations du MISEV [27], nous avons évalué l'expression de marqueurs protéiques d'origine des EVs et de pureté d'isolation (protéines non-EV co-isolées). Les résultats des western blotting ont confirmé l'identité vésiculaire des particules dans les fractions isolées avec le rotor TLA-55,

par des bandes positives pour le marqueur intraluminal ALIX et les marqueurs de surface avec TSG101 et les tétraspanines CD9, CD63 et CD81. De manière surprenante, nous n'avons pas détecté la protéine chaperonne HSP60. Nous n'avons détecté ni le marqueur du réticulum endoplasmique CALNEXIN, ni le marqueur lysosomal LC3, ni le marqueur mitochondrial TOM20 dans la préparation (Figure 10a). La contamination de l'échantillon par des éléments intracellulaires semble avoir été efficacement évitée. De manière générale, les marqueurs semblent plus saillants dans les EVs provenant des cellules en différenciation (Figure 10b).

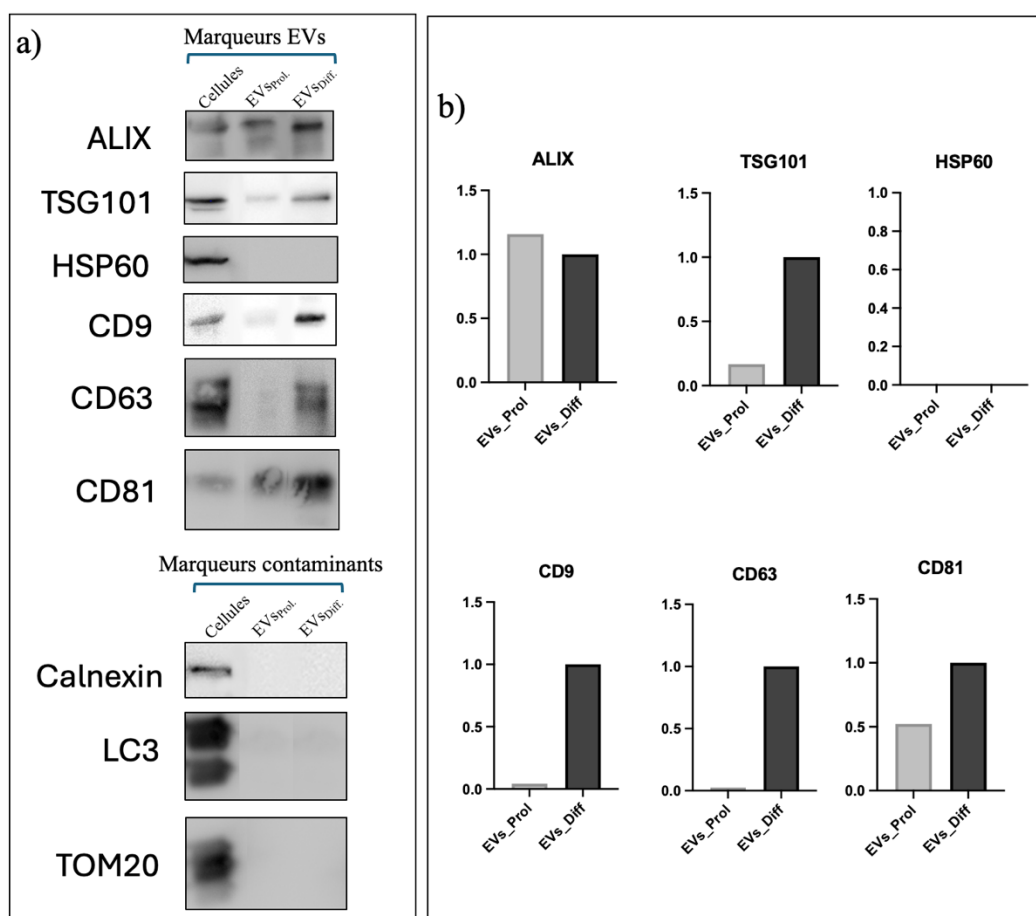


Fig. 10 – Caractérisation des vésicules extracellulaires (EVs), Marqueurs EVs et marqueurs intracellulaires : a) Bandes western blotting (ALIX, TSG101, HSP60, CD9, CD63, CD81, CALNEXIN, LC3, TOM20) ; b) Rapport enrichissement prolifération / différenciation

4.4 Enrichissement en marqueurs vésiculaires et en antioxydants des EVs libérés dans le milieu de culture après stimulation

Pour mimer l'exercice in vitro, des EPS à 1 Hz ont été appliqués sur les myotubes en culture. Des déplacements des myotubes ont été observés (voir vidéo [124]).

Les EVs isolés à partir du milieu de culture ont été caractérisés au niveau protéique par western blotting (Figure 11a). Les marqueurs des EVs ont augmenté suite à la stimulation EPS: ALIX montre une augmentation de 2.5 fois (SEM = 0.55; $p = 0.027$; $d = 1.70$) dans les EVs issus du milieu de culture des myotubes stimulés (EV-EPS) par rapport aux myotubes contrôles (EVs-CTRL). TSG101 de 2.8 fois (SEM = 1.10; $p = 0.089$; $d = 1.03$) et CD9 de 1.62 fois (SEM = 0.19; $p = 0.014$; $d = 2.13$) (figure 11b). En supprimant la valeur hors norme de TSG101 en C1, on obtient une augmentation significative de 1.7 fois (SEM = 0.16 ; $p = 0.011$; $d = 3.07$). Toutes ces augmentations deviennent cependant non significatives une fois qu'elles sont exprimées de manière relative à la concentration protéique cellulaire: ALIX est multiplié par 1.8 fois (SEM = 0.48; $p = 0.083$; $d = 1.07$). TSG101 par 1.8 fois (SEM = 0.49; $p = 0.086$; $d = 1.05$) et CD9 par 1.2 fois (SEM = 0.21; $p = 0.206$; $d = 0.579$) (figure 11c).

Nous avons décidé d'utiliser la moyenne géométrique de ces marqueurs exprimés de manière relative pour représenter le contenu vésiculaire. Celle-ci est augmentée de 1.5 fois (SEM = 0.21; $p = 0.063$; $d = 1.22$) (figure 11d). Au niveau du contenu antioxydant d'intérêt (PRDX1), nous observons une augmentation significative en valeur absolue de 1.78 fois (SEM = 0.25; $p = 0.039$; $d = 1.48$) et un enrichissement relatif significatif de 21% (SEM = 0.12; $p = 0.034$; $d = 1.57$) lorsque le contenu PRDX1 est rapporté au contenu vésiculaire (moyenne géométrique des marqueurs ALIX, TSG101, CD9) (figure 11e).

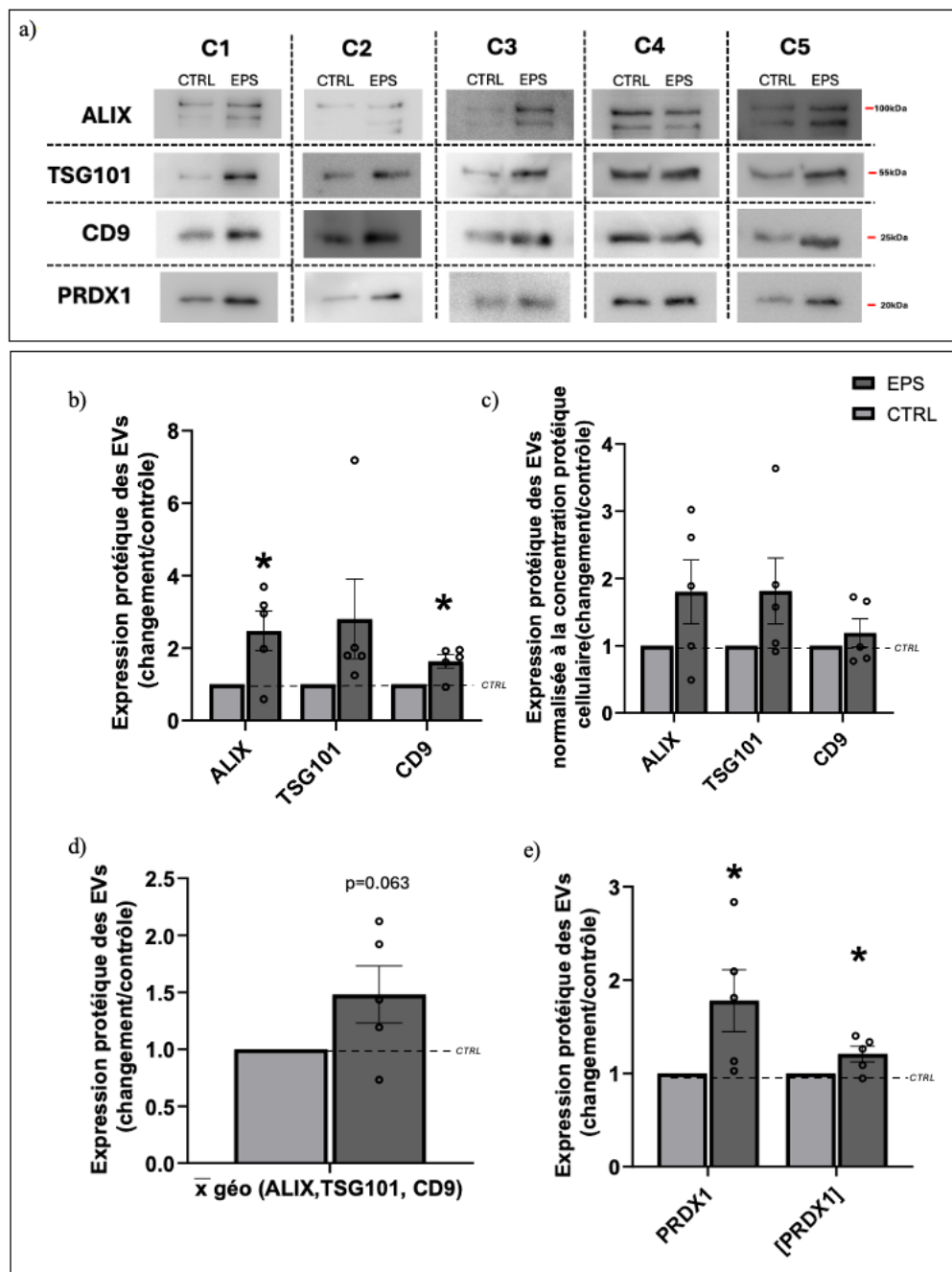


Fig. 11 – Effets de l'électrostimulation (EPS) sur le contenu protéique des vésicules extracellulaires (EVs) isolées dans le milieu de culture (n=5): a) Bandes représentatives de western blotting pour ALIX, TSG101, CD9 et PRDX1 ; b) Augmentation des marqueurs relatifs aux EVs suite à l'EPS ; c) Augmentation des marqueurs EVs normalisés par rapport à la concentration protéique cellulaire ; d) Moyenne géométrique des marqueurs des EVs (ALIX, TSG101, CD9) normalisés après EPS ; e) Augmentation de l'expression de la protéine antioxydante PRDX1 suite à l'EPS de manière absolue et relative par rapport au contenu vésiculaire (moyenne géométrique des marqueurs ALIX, TSG101, CD9).

5 DISCUSSION

Cette étude visait à mettre en place une méthode d'isolation et à caractériser les vésicules extracellulaires issues de cellules musculaires humaines primaires après stimulation électrique mimant l'exercice. À notre connaissance, il s'agit de la première étude visant à caractériser les EVs du muscle squelettique issus de culture primaire humaine stimulée. Nos résultats montrent une meilleure isolation des EVs avec le rotor TLA-55 avec une signature protéique vésiculaire claire. De plus, une tendance à l'augmentation des marqueurs protéiques des EVs ainsi qu'une augmentation significative de l'enrichissement de PRDX1 ont été observées suite à l'électrostimulation.

5.1 Comparaison du rendement des 2 ultracentrifugeuses

Nos résultats indiquent une efficacité supérieure d'isolation des vésicules extracellulaires à l'aide du rotor TLA-55 par rapport au 70 Ti (figure 9). Bien que les principes théoriques de l'ultracentrifugation pour l'isolation des EVs soient bien établis, « leur application pratique reste sujette à plusieurs variables rarement évaluées en condition réelle » [119]. Parmi ces variables, nous pouvons noter le choix du rotor et la composition du milieu de culture [119]. Théoriquement, les rotors TLA-55 et 70 Ti présentent des performances comparables, avec une force centrifuge maximale de $100\,000 \times g$ (valeur fréquemment utilisée pour l'isolation des EVs). Toutefois, une différence majeure réside dans leur k-factor, qui détermine la force appliquée aux particules dans le tube de centrifugation. Pour compenser cette différence, le temps de centrifugation avec le TLA-55 a été ajusté (voir section 3.4), conformément aux recommandations [119]. Malgré cette correction, nous avons observé des différences robustes de marqueurs protéiques vésiculaires (ALIX, CD9, TSG101) avec le TLA-55, suggérant une meilleure récupération ou préservation des vésicules. Cela ne semble pas être uniquement dû à la durée de centrifugation. En effet, il a été montré que l'allongement du temps (sur une même centrifugeuse, de 70 à 155 minutes), bien qu'il puisse influencer le contenu acido-nucléique, n'impacte pas significativement la teneur protéique totale (paramètre non évalué dans notre étude) [119]. L'une des hypothèses les plus plausibles pour expliquer cette différence repose probablement sur la géométrie du fond de tube. Il est possible que le TLA-55 offre une meilleure concentration des EVs grâce à ces tubes coniques en limitant leur perte durant le traitement post-centrifugation. De

plus, le plus faible volume des tubes utilisés avec le TLA-55 permet un traitement plus précis et moins dispersif. Suite à ces résultats nous avons donc décidé de vérifier si le profil protéique du culot obtenu avec le TLA-55 correspondait bien à celui des EVs.

5.2 Validation de l'isolation

Nous avons évalué l'identité vésiculaire et la pureté de nos échantillons d'EVs à l'aide d'une sélection de marqueurs protéiques positifs et négatifs. Nous avons montré que l'isolation des EVs semble réussie. Conformément aux recommandations MISEV (c'est-à-dire : marqueurs positifs, marqueurs négatifs, analyse morphologique, profil de taille/concentration ; ces deux derniers n'ont pas été mesurés dans le cadre de cette étude) [27], les marqueurs ALIX et TSG101, ainsi que les tétraspanines membranaires CD9, CD63 et CD81, confirment l'origine vésiculaire des particules isolées [125]. L'absence de HSP60, identifié précédemment comme marqueur protéique vésiculaire dans le plasma [73, 81], signifierait que ce marqueur ne serait pas spécifique aux SkM-EVs provenant des myotubes humains. Aucune détection n'a été observée pour les protéines associées à des structures intracellulaires, notamment CALNEXIN (réticulum endoplasmique), LC3 (autophagosomes), TOM20 (membrane mitochondriale externe). Cette absence atteste d'une bonne pureté de l'isolation.

Les signaux des marqueurs vésiculaires étaient globalement plus marqués dans les EVs issus de myotubes différenciés que dans ceux de myoblastes en prolifération, ce qui rejoint les observations de Romancino selon lequel l'expression d'ALIX est plus élevée dans les EVs libérés par les myotubes différenciés que dans celles des myoblastes en prolifération. De surcroît, il montre que l'expression de CD63 est également plus élevée en différenciation [48]. Un autre article mentionne aussi que les EVs provenant de myotubes contiennent 15 fois plus de protéines que les EVs provenant de myoblastes malgré une diminution de l'expression des marqueurs vésiculaires (ALIX, TSG101, CD63, CD81) [97]. Tous deux postulent que les myotubes en comparaison aux myoblastes relarguent préférentiellement des microvésicules, ce qui expliquerait également des différences de contenu entre les conditions de prolifération et de différenciation. Des investigations supplémentaires doivent être menées afin d'obtenir le profil de taille via analyse quantitative de particules (NTA) et/ou la microscopie pour confirmer ces hypothèses. En résumé,

avec la présence de marqueurs vésiculaires et l'absence de marqueurs des structures intracellulaires (CALNEXIN, LC3, TOM20), nous pouvons attester d'une isolation réussite.

5.3 Libération de vésicules extracellulaires dans le milieu de culture après l'électrostimulation

Nos résultats montrent que l'électrostimulation (EPS) appliquée à 1 Hz, 10V pendant 24 heures induit une augmentation non significative de la libération de vésicules extracellulaires par les myotubes en culture. Cette stimulation, conçue pour mimer la contraction musculaire in vitro, a conduit à une élévation des niveaux de marqueurs vésiculaires classiques (ALIX, TSG101, CD9). L'analyse statistique montre une augmentation significative (ALIX, CD9) ou une tendance à l'augmentation (TSG101) des marqueurs lorsqu'ils sont considérés en valeurs absolues. Cependant, ces différences s'atténuent une fois que les niveaux sont exprimés relativement au contenu protéique cellulaire réalisé à la méthode de Lowry. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer l'absence de différences significatives après normalisation par le contenu protéique cellulaire. Premièrement, une légère augmentation du contenu protéique total, bien que non significative (Tableau 1), pourrait être due à la sélection des boîtes contenant les myotubes les plus vigoureux pour la stimulation. Deuxièmement, l'électrostimulation pourrait influencer directement le contenu protéique cellulaire total, ce qui affecterait la normalisation. Enfin, il est possible que la production de vésicules extracellulaires soit indépendante du contenu protéique des cellules. Dans le cadre de ce travail nous avons pris la décision de prendre en compte les résultats normalisés par rapport au nombre de cellules indirectement estimé par le contenu protéique, une méthode couramment utilisée [126].

A notre connaissance, 4 études ont évalué l'effet de l'électrostimulation sur la libération des EVs [96-98, 127], dont 3 ont évalué l'effet aigu de l'électrostimulation [96-98]. Nie mentionne seulement que son équipe n'a pas observé plus de production d'EVs en réponse à l'EPS sans détailler les conditions et le protocole de stimulation [96]. Bydak n'a observé aucun effet avec 1h, 1Hz, 14V de stimulation, ni sur la quantité, ni sur le contenu, ni sur la fonctionnalité (effet testé sur la masse mitochondriale de cellules C2C12). Les marqueurs

vésiculaires (TSG101, CD81, ARF6) n'ont pas non plus augmenté [97]. A l'inverse, dans cet article de Murata [98], le nombre de particules est augmenté non significativement par 1.26x après une stimulation identique à ce que nous avons réalisé (24h, 1Hz, 10V) et augmenté significativement par 1.77 après une stimulation avec le même nombre d'impulsions mais en stimulation en train (24h, 10V, 1s 30Hz et 29s de repos).

Le protocole de stimulation utilisé (1 Hz, 10 V, 24 h) s'inscrit dans la lignée des modèles de contraction électrique publiés pour induire une réponse musculaire prolongée sans dommage cellulaire [116]. Toutefois, des paramètres alternatifs (fréquence plus élevée, durée plus courte) pourraient moduler différemment la réponse vésiculaire. Au regard des résultats précédents de Bydak [97], il est envisageable que la durée de stimulation joue un rôle déterminant. Une durée de 1 heure pourrait être insuffisante pour révéler une différence à l'analyse, d'autant que même après 24 heures de stimulation, l'augmentation observée reste non significative. La fréquence de stimulation quant à elle semble avoir un impact [98], malheureusement aucune étude n'a investigué cet effet isolé in vitro.

Bien que l'augmentation des protéines (ALIX, TSG101, CD9) soit statistiquement significative ou non, selon l'interprétation, le large taille de l'effet observé (Cohen's $d = 1.22$), montre que, même si les résultats ne sont pas "sûrs" statistiquement, l'ampleur de la différence est forte et pourrait être importante. De plus, une taille d'échantillon plus grande pourrait confirmer cette augmentation. Cette dernière suggère que l'électrostimulation stimule la biogenèse et/ou la libération des EVs [125]. On peut dès lors se demander si l'EPS favorise la formation d'endosomes multivésiculaires (MVB) ou leur fusion avec la membrane plasmique ou les deux phénomènes à la fois.

Parmi les potentiels mécanismes sous-jacents impliqués, nous avons notamment souligné le calcium, les niveaux d'énergie cellulaire, la mécano-transduction, les radicaux libres, les équilibres acido-basiques,... (voir point 1.3.1.3).

Dans son étude Murata a mesuré la concentration intracellulaire en calcium par fluorescence et a remarqué une augmentation durant la contraction, et une augmentation significativement plus importante pour la condition à 30Hz. Le calcium intracellulaire joue un rôle clé dans la fusion membranaire : fusion des

MVB avec la membrane plasmique (voie exosomale) et bourgeonnement direct de la membrane plasmique (voie des microvésicules)[46, 54]. Une hypothèse amenée par les chercheurs est que l'augmentation de Ca^{2+} dans les myotubes pourrait induire une augmentation du complexe ESCRT-III via ALIX [98]. En effet, il a été montré que le recrutement en aval de l'ensemble de la machinerie ESCRT-III (vers les membranes) était activée par l'ALG-2 recrutant ALIX. ALG-2 étant activé lui-même par le Ca^{2+} comme déclencheur [128].

Le niveau d'énergie des cellules est souvent mesuré grâce au rapport entre la forme active (phosphorylée) de l'AMPK et sa forme totale. L'AMPK est activée (phosphorylée en Thr172) en réponse à une baisse d'énergie intracellulaire [129]. Murata a observé une augmentation non significative de ce rapport 1.4x à (1Hz) et de 1.98x à (30Hz) au niveau des myotubes (lysats cellulaires). Des études récentes suggèrent que l'AMPK joue également un rôle dans la régulation de la libération d'EVs [130, 131]. L'inhibition de l'AMPK via le composé C impacte le relargage négativement dans les cellules gliales [131] mais positivement dans les cellules adipeuses [130]. TSG101 et le mécanisme dépendant de ESCRT sembleraient nécessaires à la formation d'EVs induite par l'inhibition d'AMPK α 1. Dans cette dernière étude sur le tissu adipeux, la metformine (médicament antidiabétique) connue pour agir sur la voie de l'AMPK, réduit l'excrétion vésiculaire [130].

La mécano-transduction est un point important pour le modèle EPS. En effet, l'observation potentielle d'un déplacement des myotubes durant la stimulation est faible. Ce phénomène cause un étirement de la membrane plasmique permettant une entrée de calcium intracellulaire. A l'inverse de Murata, Nie et Bydak ne mentionnent pas avoir observé ces contractions. Nous pouvons en attester (voir vidéo [124]). La transmission d'un signal mécanique modifie le cytosquelette nécessaire au bourgeonnement des vésicules [46]. Ce déplacement confirme aussi la réussite de l'utilisation EPS.

Des radicaux libres peuvent être produits en excès lors d'une augmentation de la demande énergétique ou encore lors de l'étirement membranaire, comme par exemple lors de la contraction musculaire [132]. Au niveau mitochondrial notamment, la production accrue d'ATP provoque une augmentation de la

production de ROS [132] et ceux-ci comme, seconds messagers, déclencheraient des voies qui favorisent la libération d'EVs [133].

La voie de l'inflammation TLR/NF- κ B pourrait aussi contribuer à cette augmentation des EVs à l'exercice [134]. Dans l'étude de Murata, les niveaux d'IL6 ont augmenté dans les myotubes stimulés majoritairement sur le protocole à 1Hz. En résumé, des recherches plus approfondies devraient être menées sur les potentiels mécanismes sous-jacents de manière à identifier ceux responsables de l'augmentation en EVs (voir point 5.5. Limites et perspectives)

Les cellules musculaires primaires choisies dans le cas de notre étude conservent des caractéristiques plus proches du muscle *in vivo* [110] comparé à des lignées murines immortalisées (comme C2C12 dans les articles mentionnés ci-dessus). Cela renforce la pertinence et représentativité physiologique des résultats observés avec l'EPS sur la libération des EVs. La variabilité inter-donneurs est aussi un atout car la variabilité génétique pourrait influencer la réponse.

En conclusion, cette tendance à l'augmentation vésiculaire via le modèle EPS dans le muscle squelettique concorde avec les augmentations de SkM-EVs observées *in vivo* [74, 75]. La sensibilité des mécanismes impliqués dans la biogénèse vésiculaire doit être prise en compte pour mieux comprendre les variations observées. Ces résultats soulignent l'importance du muscle squelettique comme organe excréteur et endocrinien.

5.4 Enrichissement antioxydant des vésicules extracellulaires provenant du milieu de culture des myotubes stimulés

Le contenu antioxydant semble augmenter via une augmentation absolue et relative des PRDX1. Cet enrichissement des peroxyrédoxines au sein des EVs s'élève à 21%. Ceci indique que l'EPS pourrait aussi avoir un impact sur la biogénèse des EVs et sur la sélection de leur contenu. Les EVs produites en réponse à l'exercice pourraient donc jouer un rôle dans la protection redox systémique, comme cela a été proposé pour les vésicules libérées après l'exercice *in vivo* [135].

En l'absence de mesure de quantification EVs, par exemple la NTA, nous avons choisi une méthode de normalisation par moyennage géométrique des marqueurs

vésiculaires. Certains marqueurs très abondants comparés à d'autres moins abondants biaisent en effet la moyenne arithmétique. La moyenne géométrique réduit ainsi l'influence disproportionnée d'un marqueur. Cela suppose que chaque marqueur a une importance équivalente pour quantifier la présence d'EVs.

Une augmentation de PRDX1 dans les EVs peut être liée à plusieurs processus biologiques associés au stress oxydatif. Le rôle de PRDX1 est d'éliminer les peroxydes (surtout H_2O_2) en les réduisant, ce qui prévient les dommages oxydatifs sur les protéines, les lipides et l'ADN [136]. En effet, lors de l'exercice ou de la contraction, la mitochondrie, le sarcoplasme, et d'autres sources cellulaires (comme les NADPH oxydases) génèrent davantage de ROS (H_2O_2 , O_2^-) [104]. En réponse à cela, la cellule met en place un système antioxydant.

PRDX1 appartient à la famille des peroxyrédoxines à 2 cystéines, ce qui suggère qu'en plus du rôle de peroxydase, elle a également un rôle dans la signalisation cellulaire [136]. Après sa réaction avec le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou d'autres peroxydes, la cystéine (Cys-SH) forme une cystéine sulfénique (Cys-SOH) et les deux cystéines forment alors un pont disulfure entre elles. Cette forme oxydée interagit avec la Thioredoxine qui peut activer des voies de signalisation comme celle de NF- κ B, ou celle des MAPK [136].

PRDX1 est localisée dans tous les sous-compartiments cellulaires. Les études se sont concentrées sur sa localisation dans le cytosol ou dans la matrice mitochondriale [136]. Il a été suggéré que sa régulation était finement liée avec celle de H_2O_2 , donc, théoriquement, logiquement augmenté à la suite de la contraction musculaire puisque les radicaux libres sont augmentés (autour de 10^{-7} mol/l dans les fibres du muscle squelettique à la suite de la contraction [137]). D'ailleurs, il a été montré dernièrement qu'une inactivation du gène spécifique PRDX2 ('Knock-out') combiné à une contraction des myotubes induite par EPS annihile l'effet sur la biogénèse mitochondriale (via PGC1 α) et augmente les gènes de l'apoptose et les cytokines inflammatoires par rapport à une condition de stimulation contrôle [137].

La dernière étude de Warnier (données non publiées) investiguait le contenu protéique des EVs systémiques suite à un exercice aigu dans le contexte de

l'obésité. A la suite de la session d'entraînement (30min à 60% de $VO_2\text{max}$), les EVs n'ont augmenté ni à l'analyse de nanoparticule, ni au niveau des marqueurs protéiques. La spectroscopie de masse a révélé l'augmentation de l'expression des peroxyredoxines. Ces résultats s'alignent sur une série d'autres études montrant une augmentation du contenu antioxydant à la suite d'un exercice [104, 108, 135]. Des évidences grandissantes suggèrent que la biogénèse vésiculaire est sensible au statut d'oxydo-réduction [133]. Le stress oxydatif augmenterait la vésiculation et impacterait le contenu antioxydant et pro-oxydant de ces vésicules. Par exemple, dans cette étude de Lisi [107], le contenu antioxydant vésiculaire à la suite de l'exercice peut activer des mécanismes de défense et de régénération redox dans les cellules cardiomyocytaires réceptrices.

Nous nous sommes ensuite interrogé sur la magnitude d'une augmentation de 21%. Dans son étude, Warnier a observé une augmentation de 29% de PRDX1 (après 12 semaines avec 3 sessions par semaine) exprimée de manière relative aux marqueurs vésiculaires (données issues du laboratoire IONS/CEMO/EXR6 mais non publiées). La normalisation a été effectuée avec la moyenne géométrique des marqueurs CD9, ALIX et TSG101, tout comme dans le présent mémoire. Il est inopportun de comparer des données in vitro avec des données in vivo, toutefois on peut affirmer que le muscle squelettique pourrait être impliqué dans cette augmentation et on peut se demander si d'autres organes sont concernés

En résumé, l'EPS et donc l'exercice par extrapolation semblent avoir un effet sur le contenu antioxydant dans les EVs du muscle squelettique. Les PRDX1 dans nos SkM-EVs pourraient par conséquent avoir une fonction régulatrice et moduler la réponse antioxydante dans d'autres tissus (ceux du foie, du cerveau, et du système immunitaire, du tissu adipeux).

5.5 Limites et Perspectives

Au vu des résultats, nous avons montré une isolation des EVs réussie par ultracentrifugation différentielle. Au-delà du fait que ce soit une méthode standardisée et largement utilisée (18/28 articles sélectionnés ont utilisé l'ultracentrifugation différentielle pour l'isolation d'EVs à partir d'un milieu de culture sur myotube, cités au point 2.3.2), les avantages de l'ultracentrifugation sont

notables. Premièrement, elle n'introduit aucun réactif chimique pouvant contaminer l'échantillon. Deuxièmement, elle peut traiter des volumes plus importants de fluides biologiques ce qui est intéressant dans notre cas avec un potentiellement faible rendement du muscle squelettique en EVs [57]. Troisièmement, elle est relativement peu coûteuse. Toutefois, l'ultracentrifugation comporte certaines limites : une faible récupération à cause des faibles rendements d'EVs [138], des pertes dues à la liaison non spécifique des EVs aux plastiques [139], des agrégations d'EVs et la rupture de la membrane lors de la remise en suspension du culot [140]. C'est pourquoi mettre en place un protocole standardisé est important car ces différentes limites peuvent impacter les résultats. En raison du chevauchement des caractéristiques des EVs par rapport aux petites particules non-vésiculaires et en l'absence de confirmation visuelle (microscopie électronique : paramètre non évalué dans notre étude), il est difficile d'affirmer avec certitude que les particules isolées sont bien des EVs. Toutefois, les recherches précédentes, utilisant des protocoles d'ultracentrifugation classiques (sans réactifs) et similaires (même durée et vitesse de centrifugation), ont confirmé la présence de vésicules extracellulaires issues du muscle squelettique grâce à la microscopie électronique à transmission [74, 88, 91, 99].

Malgré cette tendance globale à l'augmentation des marqueurs, une variabilité inter-échantillon notable est en effet observée pour certains marqueurs, comme en témoigne l'erreur standard moyenne élevée de TSG101 ($SEM = 1.10$). Ce point invite à une interprétation nuancée des résultats et met en avant la nécessité de valider ces observations à l'aide d'autres méthodes de quantification, telles que l'analyse de suivi des nanoparticules (NTA) ou la cytométrie de flux. Ces approches combinées avec les marqueurs vésiculaires permettraient une évaluation plus précise du nombre et la morphologie des EVs [41].

Dans notre étude, nous n'avons pas utilisé de méthode capable de discriminer les mécanismes impliqués dans la libération de vésicules. Par exemple, pour le rôle calcique, il aurait été possible de mesurer la fluorescence ou d'utiliser un chélateur de calcium pour évaluer son effet [141]. Une analyse des marqueurs calcio-dépendants pertinents (CaMKII et pCaMKII ; Calcineurine A) au niveau des lysats cellulaires permettrait d'évaluer l'impact du calcium [142]. D'autres évaluations

protéiques comme le rapport pAMPK / AMPK total et la voie de NF- κ B pourraient être effectués sur les lysats cellulaires pour identifier des potentiels responsables de cette tendance à l'augmentation des EVs.

En résumé, des recherches plus approfondies devraient être menées sur les potentiels mécanismes sous-jacents de manière à identifier ceux responsables de l'augmentation en EVs.

Il serait également pertinent d'investiguer l'effet fonctionnel des EVs enrichies en PRDX1 sur des cellules cibles. Par exemple, il serait intéressant d'évaluer si ces EVs peuvent renforcer les défenses antioxydantes dans divers types de cellules. L'augmentation de 21 % observée dans la teneur en PRDX1 peut paraître modérée, mais son impact biologique pourrait cependant être significatif.

Il est bien connu qu'une des adaptations à l'exercice est une gestion de l'homéostasie redox en diminuant la quantité de ROS produites et en étant capable de mieux les neutraliser. Le transport via les EVs pourrait être une de ces adaptations.

6 CONCLUSION

En conclusion, cette étude a permis de développer un modèle pour étudier les vésicules extracellulaires issues de cellules musculaires humaines primaires in vitro ainsi qu'une méthode optimisée pour les isoler. Les résultats démontrent que le rotor TLA-55 offre une isolation plus efficace des EVs comparé au 70 Ti. L'électrostimulation a induit une tendance à l'augmentation de la libération des EVs, confirmée par une hausse des marqueurs ALIX, TSG101 et CD9. De plus, une augmentation spécifique et significative de PRDX1 a été observée, suggérant un enrichissement antioxydant au sein des EVs. Par conséquent, cette étude apporte de nouvelles connaissances sur la capacité du muscle squelettique stimulé à libérer des EVs, potentiellement impliqués dans la communication intercellulaire et la modulation du stress oxydatif systémique.

7 BIBLIOGRAPHIE

1. Sullivan, M.D., *Reconsidering the wisdom of the body: an epistemological critique of Claude Bernard's concept of the internal environment*. J Med Philos, 1990. **15**(5): p. 493-514.
2. Noble, D., *Claude Bernard, the first systems biologist, and the future of physiology*. Exp Physiol, 2008. **93**(1): p. 16-26.
3. Modell, H., et al., *A physiologist's view of homeostasis*. Adv Physiol Educ, 2015. **39**(4): p. 259-66.
4. Park, J.H., et al., *Sedentary Lifestyle: Overview of Updated Evidence of Potential Health Risks*. Korean J Fam Med, 2020. **41**(6): p. 365-373.
5. Bystron, J.M., *Sedentary lifestyle and remote working as predisposing factors for cancer development*. Environmental Medicine, 2023. **26**(3-4): p. 114-118.
6. Egan, B. and J.R. Zierath, *Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation*. Cell Metab, 2013. **17**(2): p. 162-84.
7. Lu, Y., et al., *Effects of High Intensity Exercise on Oxidative Stress and Antioxidant Status in Untrained Humans: A Systematic Review*. Biology (Basel), 2021. **10**(12).
8. Taylor, D.F. and D.J. Bishop, *Transcription Factor Movement and Exercise-Induced Mitochondrial Biogenesis in Human Skeletal Muscle: Current Knowledge and Future Perspectives*. Int J Mol Sci, 2022. **23**(3).
9. Panwar, V., et al., *Multifaceted role of mTOR (mammalian target of rapamycin) signaling pathway in human health and disease*. Signal Transduct Target Ther, 2023. **8**(1): p. 375.
10. Bishop, D.J., et al., *Discordant skeletal muscle gene and protein responses to exercise*. Trends Biochem Sci, 2023. **48**(11): p. 927-936.
11. Coffey, V.G. and J.A. Hawley, *The molecular bases of training adaptation*. Sports Med, 2007. **37**(9): p. 737-63.
12. Hawley, J.A., et al., *Maximizing Cellular Adaptation to Endurance Exercise in Skeletal Muscle*. Cell Metab, 2018. **27**(5): p. 962-976.
13. Pedersen, B.K. and B. Saltin, *Exercise as medicine - evidence for prescribing exercise as therapy in 26 different chronic diseases*. Scand J Med Sci Sports, 2015. **25 Suppl 3**: p. 1-72.
14. Atakan, M.M., et al., *Small peptides: could they have a big role in metabolism and the response to exercise?* J Physiol, 2024. **602**(4): p. 545-568.
15. Gonzalez-Gil, A.M. and L. Elizondo-Montemayor, *The Role of Exercise in the Interplay between Myokines, Hepatokines, Osteokines, Adipokines, and Modulation of Inflammation for Energy Substrate Redistribution and Fat Mass Loss: A Review*. Nutrients, 2020. **12**(6).
16. Murphy, R.M., M.J. Watt, and M.A. Febbraio, *Metabolic communication during exercise*. Nat Metab, 2020. **2**(9): p. 805-816.
17. Kirk, B., et al., *Muscle, Bone, and Fat Crosstalk: the Biological Role of Myokines, Osteokines, and Adipokines*. Curr Osteoporos Rep, 2020. **18**(4): p. 388-400.
18. Whitham, M. and M.A. Febbraio, *The ever-expanding myokinome: discovery challenges and therapeutic implications*. Nat Rev Drug Discov, 2016. **15**(10): p. 719-29.

19. Pedersen, B.K. and M.A. Febbraio, *Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ*. Nat Rev Endocrinol, 2012. **8**(8): p. 457-65.
20. Febbraio, M.A., et al., *Interleukin-6 is a novel factor mediating glucose homeostasis during skeletal muscle contraction*. Diabetes, 2004. **53**(7): p. 1643-8.
21. Pedersen, B.K., A. Steensberg, and P. Schjerling, *Exercise and interleukin-6*. Curr Opin Hematol, 2001. **8**(3): p. 137-41.
22. Pedersen, L., et al., *Voluntary Running Suppresses Tumor Growth through Epinephrine- and IL-6-Dependent NK Cell Mobilization and Redistribution*. Cell Metab, 2016. **23**(3): p. 554-62.
23. Pedersen, B.K., *Physical activity and muscle-brain crosstalk*. Nat Rev Endocrinol, 2019. **15**(7): p. 383-392.
24. Safdar, A. and M.A. Tarnopolsky, *Exosomes as Mediators of the Systemic Adaptations to Endurance Exercise*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2018. **8**(3).
25. Guay, C. and R. Regazzi, *Exosomes as new players in metabolic organ cross-talk*. Diabetes Obes Metab, 2017. **19 Suppl 1**: p. 137-146.
26. Haroon, H.B., et al., *A brief history of long circulating nanoparticles*. Adv Drug Deliv Rev, 2022. **188**: p. 114396.
27. Thery, C., et al., *Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines*. J Extracell Vesicles, 2018. **7**(1): p. 1535750.
28. Kalra, H., et al., *Vesiclepedia: a compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation*. PLoS Biol, 2012. **10**(12): p. e1001450.
29. Colombo, M., G. Raposo, and C. Thery, *Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2014. **30**: p. 255-89.
30. Chargaff, E. and R. West, *The biological significance of the thromboplastic protein of blood*. J Biol Chem, 1946. **166**(1): p. 189-97.
31. Rodrigues, M.L., et al., *Vesicular polysaccharide export in Cryptococcus neoformans is a eukaryotic solution to the problem of fungal trans-cell wall transport*. Eukaryot Cell, 2007. **6**(1): p. 48-59.
32. Regente, M., et al., *Vesicular fractions of sunflower apoplasmic fluids are associated with potential exosome marker proteins*. FEBS Lett, 2009. **583**(20): p. 3363-6.
33. Turner, N.P., *Food-derived extracellular vesicles in the human gastrointestinal tract: Opportunities for personalised nutrition and targeted therapeutics*. J Extracell Biol, 2024. **3**(5): p. e154.
34. Lee, Y., et al., *Recent advances of small extracellular vesicle biomarkers in breast cancer diagnosis and prognosis*. Mol Cancer, 2023. **22**(1): p. 33.
35. Sonar, S., et al., *Exosome-based cancer vaccine: a cell-free approach*. Mol Biol Rep, 2025. **52**(1): p. 421.
36. Wolf, P., *The nature and significance of platelet products in human plasma*. Br J Haematol, 1967. **13**(3): p. 269-88.
37. Harding, C., J. Heuser, and P. Stahl, *Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes*. J Cell Biol, 1983. **97**(2): p. 329-39.
38. Pan, B.T. and R.M. Johnstone, *Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor*. Cell, 1983. **33**(3): p. 967-78.

39. Raposo, G., et al., *B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles*. J Exp Med, 1996. **183**(3): p. 1161-72.
40. Valadi, H., et al., *Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(6): p. 654-9.
41. Welsh, J.A., et al., *Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches*. J Extracell Vesicles, 2024. **13**(2): p. e12404.
42. Lotvall, J., et al., *Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles*. J Extracell Vesicles, 2014. **3**: p. 26913.
43. Minciacchi, V.R., et al., *Large oncosomes contain distinct protein cargo and represent a separate functional class of tumor-derived extracellular vesicles*. Oncotarget, 2015. **6**(13): p. 11327-41.
44. Babst, M., *MVB vesicle formation: ESCRT-dependent, ESCRT-independent and everything in between*. Curr Opin Cell Biol, 2011. **23**(4): p. 452-7.
45. Kowal, J., M. Tkach, and C. Thery, *Biogenesis and secretion of exosomes*. Curr Opin Cell Biol, 2014. **29**: p. 116-25.
46. Gurunathan, S., et al., *Biogenesis, Membrane Trafficking, Functions, and Next Generation Nanotherapeutics Medicine of Extracellular Vesicles*. Int J Nanomedicine, 2021. **16**: p. 3357-3383.
47. Bongiovanni, A., et al., *Alix protein is substrate of Ozz-E3 ligase and modulates actin remodeling in skeletal muscle*. J Biol Chem, 2012. **287**(15): p. 12159-71.
48. Romancino, D.P., et al., *Identification and characterization of the nano-sized vesicles released by muscle cells*. FEBS Lett, 2013. **587**(9): p. 1379-84.
49. Choezom, D. and J.C. Gross, *Neutral sphingomyelinase 2 controls exosome secretion by counteracting V-ATPase-mediated endosome acidification*. J Cell Sci, 2022. **135**(5).
50. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P., *Chapter 16 : The cytoskeleton*, in *Molecular Biology of the Cell* G. Science, Editor. 2002. p. 952.
51. Zhen, Y. and H. Stenmark, *Cellular functions of Rab GTPases at a glance*. J Cell Sci, 2015. **128**(17): p. 3171-6.
52. Wei, Y., et al., *Pyruvate kinase type M2 promotes tumour cell exosome release via phosphorylating synaptosome-associated protein 23*. Nat Commun, 2017. **8**: p. 14041.
53. Li, B., et al., *RhoA triggers a specific signaling pathway that generates transforming microvesicles in cancer cells*. Oncogene, 2012. **31**(45): p. 4740-9.
54. Savina, A., et al., *Exosome release is regulated by a calcium-dependent mechanism in K562 cells*. J Biol Chem, 2003. **278**(22): p. 20083-90.
55. Garcia-Martin, R., et al., *MicroRNA sequence codes for small extracellular vesicle release and cellular retention*. Nature, 2022. **601**(7893): p. 446-451.
56. Vechetti, I.J., Jr., et al., *Mechanical overload-induced muscle-derived extracellular vesicles promote adipose tissue lipolysis*. Faseb j, 2021. **35**(6): p. e21644.

57. Guescini, M., et al., *Muscle Releases Alpha-Sarcoglycan Positive Extracellular Vesicles Carrying miRNAs in the Bloodstream*. PLoS One, 2015. **10**(5): p. e0125094.
58. Greening, D.W. and R.J. Simpson, *Understanding extracellular vesicle diversity - current status*. Expert Rev Proteomics, 2018. **15**(11): p. 887-910.
59. Mulcahy, L.A., R.C. Pink, and D.R. Carter, *Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake*. J Extracell Vesicles, 2014. **3**.
60. Chen, Y.A. and R.H. Scheller, *SNARE-mediated membrane fusion*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(2): p. 98-106.
61. Feng, D., et al., *Cellular internalization of exosomes occurs through phagocytosis*. Traffic, 2010. **11**(5): p. 675-87.
62. Morimoto, K., et al., *Extracellular Microvesicles Modified with Arginine-Rich Peptides for Active Macropinocytosis Induction and Delivery of Therapeutic Molecules*. ACS Appl Mater Interfaces, 2024. **16**(14): p. 17069-17079.
63. Christianson, H.C., et al., *Cancer cell exosomes depend on cell-surface heparan sulfate proteoglycans for their internalization and functional activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(43): p. 17380-5.
64. Gomzikova, M., et al., *Evaluation of Cytochalasin B-Induced Membrane Vesicles Fusion Specificity with Target Cells*. Biomed Res Int, 2018. **2018**: p. 7053623.
65. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P., *Chapter 15 : Cell communication*, in *Molecular Biology of the Cell* G. Science, Editor. 2002. p. 844.
66. van Niel, G., G. D'Angelo, and G. Raposo, *Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2018. **19**(4): p. 213-228.
67. Abdouh, M., et al., *Exosomes isolated from cancer patients' sera transfer malignant traits and confer the same phenotype of primary tumors to oncosuppressor-mutated cells*. J Exp Clin Cancer Res, 2017. **36**(1): p. 113.
68. Fan, G.C., *Hypoxic exosomes promote angiogenesis*. Blood, 2014. **124**(25): p. 3669-70.
69. Sokolov, A.V., et al., *Targeted Drug Delivery in Lipid-like Nanocages and Extracellular Vesicles*. Acta Naturae, 2019. **11**(2): p. 28-41.
70. Fröhbeis, C., et al., *Physical exercise induces rapid release of small extracellular vesicles into the circulation*. J Extracell Vesicles, 2015. **4**: p. 28239.
71. Whitham, M., et al., *Extracellular Vesicles Provide a Means for Tissue Crosstalk during Exercise*. Cell Metab, 2018. **27**(1): p. 237-251 e4.
72. Chong, M.C., et al., *Exercise increases the release of NAMPT in extracellular vesicles and alters NAD(+) activity in recipient cells*. Aging Cell, 2022. **21**(7): p. e13647.
73. Warnier, G., et al., *Effects of an acute exercise bout in hypoxia on extracellular vesicle release in healthy and prediabetic subjects*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2022. **322**(2): p. R112-R122.
74. Maggio, S., et al., *Modulation of the Circulating Extracellular Vesicles in Response to Different Exercise Regimens and Study of Their Inflammatory Effects*. Int J Mol Sci, 2023. **24**(3).
75. Rigamonti, A.E., et al., *Effects of an acute bout of exercise on circulating extracellular vesicles: tissue-, sex-, and BMI-related differences*. Int J Obes (Lond), 2020. **44**(5): p. 1108-1118.

76. Kyriakidou, Y., et al., *Preliminary Investigations Into the Effect of Exercise-Induced Muscle Damage on Systemic Extracellular Vesicle Release in Trained Younger and Older Men*. Front Physiol, 2021. **12**: p. 723931.
77. D'Souza, R.F., et al., *Circulatory exosomal miRNA following intense exercise is unrelated to muscle and plasma miRNA abundances*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2018. **315**(4): p. E723-E733.
78. Warnier, G., *Extracellular vesicle regulation by exercise in health and disease*, in *IONS (institute of neuroscience)*. 2024, UCLouvain.
79. Heiston, E.M., et al., *Acute exercise decreases insulin-stimulated extracellular vesicles in conjunction with augmentation index in adults with obesity*. J Physiol, 2023. **601**(22): p. 5033-5050.
80. Kargl, C.K., et al., *Circulating extracellular vesicle characteristics differ between men and women following 12 weeks of concurrent exercise training*. Physiol Rep, 2024. **12**(9): p. e16016.
81. Warnier, G., et al., *Effects of a 6-wk Sprint Interval Training Protocol at Different Altitudes on Circulating Extracellular Vesicles*. Med Sci Sports Exerc, 2023. **55**(1): p. 46-54.
82. Hou, Z., et al., *Longterm Exercise-Derived Exosomal miR-342-5p: A Novel Exerkine for Cardioprotection*. Circ Res, 2019. **124**(9): p. 1386-1400.
83. Darragh, I.A.J., et al., *The separation and identification of circulating small extracellular vesicles from endurance-trained, strength-trained and recreationally active men*. J Physiol, 2023. **601**(22): p. 5075-5091.
84. Nederveen, J.P., et al., *Extracellular Vesicles and Exosomes: Insights From Exercise Science*. Front Physiol, 2020. **11**: p. 604274.
85. Camera, D.M., W.J. Smiles, and J.A. Hawley, *Exercise-induced skeletal muscle signaling pathways and human athletic performance*. Free Radic Biol Med, 2016. **98**: p. 131-143.
86. Brahmer, A., et al., *Platelets, endothelial cells and leukocytes contribute to the exercise-triggered release of extracellular vesicles into the circulation*. J Extracell Vesicles, 2019. **8**(1): p. 1615820.
87. Guescini, M., et al., *C2C12 myoblasts release micro-vesicles containing mtDNA and proteins involved in signal transduction*. Exp Cell Res, 2010. **316**(12): p. 1977-84.
88. Watanabe, S., et al., *Skeletal muscle releases extracellular vesicles with distinct protein and microRNA signatures that function in the muscle microenvironment*. PNAS Nexus, 2022. **1**(4): p. pgac173.
89. Le Bihan, M.C., et al., *In-depth analysis of the secretome identifies three major independent secretory pathways in differentiating human myoblasts*. J Proteomics, 2012. **77**: p. 344-56.
90. Hettinger, Z.R., et al., *Extracellular vesicles released from stress-induced prematurely senescent myoblasts impair endothelial function and proliferation*. Exp Physiol, 2021. **106**(10): p. 2083-2095.
91. Davies, O.G., et al., *Spectroscopic profiling variations in extracellular vesicle biochemistry in a model of myogenesis*. J Tissue Eng, 2021. **12**: p. 20417314211022092.
92. Fernandez-Rhodes, M., et al., *Extracellular vesicles may provide an alternative detoxification pathway during skeletal muscle myoblast ageing*. J Extracell Biol, 2024. **3**(8): p. e171.
93. Estrada, A.L., et al., *Extracellular vesicle secretion is tissue-dependent ex vivo and skeletal muscle myofiber extracellular vesicles reach the circulation in vivo*. Am J Physiol Cell Physiol, 2022. **322**(2): p. C246-C259.

94. Ma, S., et al., *Skeletal muscle-derived extracellular vesicles transport glycolytic enzymes to mediate muscle-to-bone crosstalk*. Cell Metab, 2023. **35**(11): p. 2028-2043 e7.
95. Huang, H., et al., *Muscle-derived extracellular vesicles improve disuse-induced osteoporosis by rebalancing bone formation and bone resorption*. Acta Biomater, 2023. **157**: p. 609-624.
96. Nie, Y., et al., *Skeletal muscle-derived exosomes regulate endothelial cell functions via reactive oxygen species-activated nuclear factor-kappaB signalling*. Exp Physiol, 2019. **104**(8): p. 1262-1273.
97. Bydak, B., et al., *Characterizing Extracellular Vesicles and Particles Derived from Skeletal Muscle Myoblasts and Myotubes and the Effect of Acute Contractile Activity*. Membranes (Basel), 2022. **12**(5).
98. Murata, A., et al., *Electrical pulse stimulation-induced tetanic exercise simulation increases the secretion of extracellular vesicles from C2C12 myotubes*. Biochem Biophys Res Commun, 2023. **672**: p. 177-184.
99. Obi, P.O., et al., *Extracellular Vesicles Released From Skeletal Muscle Post-Chronic Contractile Activity Increase Mitochondrial Biogenesis in Recipient Myoblasts*. J Extracell Vesicles, 2025. **14**(4): p. e70045.
100. Madison, R.D., et al., *Extracellular vesicles from a muscle cell line (C2C12) enhance cell survival and neurite outgrowth of a motor neuron cell line (NSC-34)*. J Extracell Vesicles, 2014. **3**.
101. Choi, J.S., et al., *Exosomes from differentiating human skeletal muscle cells trigger myogenesis of stem cells and provide biochemical cues for skeletal muscle regeneration*. J Control Release, 2016. **222**: p. 107-15.
102. Kargl, C.K., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha overexpression improves angiogenic signalling potential of skeletal muscle-derived extracellular vesicles*. Exp Physiol, 2023. **108**(2): p. 240-252.
103. Guescini, M., et al., *Extracellular Vesicles Released by Oxidatively Injured or Intact C2C12 Myotubes Promote Distinct Responses Converging toward Myogenesis*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(11).
104. de Sousa, C.V., et al., *The Antioxidant Effect of Exercise: A Systematic Review and Meta-Analysis*. Sports Med, 2017. **47**(2): p. 277-293.
105. Napolitano, G., G. Fasciolo, and P. Venditti, *Mitochondrial Management of Reactive Oxygen Species*. Antioxidants (Basel), 2021. **10**(11).
106. Ostrom, E.L., et al., *High intensity muscle stimulation activates a systemic Nrf2-mediated redox stress response*. Free Radic Biol Med, 2021. **172**: p. 82-89.
107. Lisi, V., et al., *Plasma-derived extracellular vesicles released after endurance exercise exert cardioprotective activity through the activation of antioxidant pathways*. Redox Biol, 2023. **63**: p. 102737.
108. Lisi, V., et al., *Steady-state redox status in circulating extracellular vesicles: A proof-of-principle study on the role of fitness level and short-term aerobic training in healthy young males*. Free Radic Biol Med, 2023. **204**: p. 266-275.
109. Soriano-Arroquia, A., et al., *Preparation and Culture of Myogenic Precursor Cells/Primary Myoblasts from Skeletal Muscle of Adult and Aged Humans*. J Vis Exp, 2017(120).
110. Heden, T.D., et al., *Greater Oxidative Capacity in Primary Myotubes from Endurance-trained Women*. Med Sci Sports Exerc, 2017. **49**(11): p. 2151-2157.

111. Nehlin, J.O., et al., *Human myotubes from myoblast cultures undergoing senescence exhibit defects in glucose and lipid metabolism*. Biogerontology, 2011. **12**(4): p. 349-65.
112. Hernandez-Hernandez, J.M., et al., *The myogenic regulatory factors, determinants of muscle development, cell identity and regeneration*. Semin Cell Dev Biol, 2017. **72**: p. 10-18.
113. Shelke, G.V., et al., *Importance of exosome depletion protocols to eliminate functional and RNA-containing extracellular vesicles from fetal bovine serum*. J Extracell Vesicles, 2014. **3**.
114. Théry, C., et al., *Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids*. Curr Protoc Cell Biol, 2006. **Chapter 3**: p. Unit 3.22.
115. Nikolic, N. and V. Aas, *Electrical Pulse Stimulation of Primary Human Skeletal Muscle Cells*. Methods Mol Biol, 2019. **1889**: p. 17-24.
116. Nikolić, N., et al., *Electrical pulse stimulation of cultured skeletal muscle cells as a model for in vitro exercise - possibilities and limitations*. Acta Physiol (Oxf), 2017. **220**(3): p. 310-331.
117. Lambernd, S., et al., *Contractile activity of human skeletal muscle cells prevents insulin resistance by inhibiting pro-inflammatory signalling pathways*. Diabetologia, 2012. **55**(4): p. 1128-39.
118. Valero-Breton, M., et al., *Acute and Chronic Effects of High Frequency Electric Pulse Stimulation on the Akt/mTOR Pathway in Human Primary Myotubes*. Front Bioeng Biotechnol, 2020. **8**: p. 565679.
119. Cvjetkovic, A., J. Lotvall, and C. Lasser, *The influence of rotor type and centrifugation time on the yield and purity of extracellular vesicles*. J Extracell Vesicles, 2014. **3**.
120. Jeppesen, D.K., et al., *Comparative analysis of discrete exosome fractions obtained by differential centrifugation*. J Extracell Vesicles, 2014. **3**: p. 25011.
121. Waterborg, J.H. and H.R. Matthews, *The Lowry method for protein quantitation*. Methods Mol Biol, 1994. **32**: p. 1-4.
122. Mahmood, T. and P.C. Yang, *Western blot: technique, theory, and trouble shooting*. N Am J Med Sci, 2012. **4**(9): p. 429-34.
123. Bajaj, P., et al., *Patterning the differentiation of C2C12 skeletal myoblasts*. Integr Biol (Camb), 2011. **3**(9): p. 897-909.
124. Théo, M., *Électrostimulation (EPS) de myotubes humains primaires en culture*. 2025: <https://vimeo.com/1083244057?share=copy#t=0>.
125. Jeppesen, D.K., et al., *Reassessment of Exosome Composition*. Cell, 2019. **177**(2): p. 428-445 e18.
126. Ostrander, G.K., et al., *Long-term primary culture of epithelial cells from rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* liver*. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 1995. **31**(5): p. 367-78.
127. Obi, P.O., et al., *Chronic contractile activity induced skeletal muscle-derived extracellular vesicles increase mitochondrial biogenesis in recipient myocytes via transmembrane or peripheral membrane proteins*. bioRxiv, 2024: p. 2024.08.01.605916.
128. Shukla, S., et al., *In vitro reconstitution of calcium-dependent recruitment of the human ESCRT machinery in lysosomal membrane repair*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2022. **119**(35): p. e2205590119.

129. Willows, R., et al., *Phosphorylation of AMPK by upstream kinases is required for activity in mammalian cells*. *Biochem J*, 2017. **474**(17): p. 3059-3073.
130. Yan, C., et al., *A High-Fat Diet Attenuates AMPK α 1 in Adipocytes to Induce Exosome Shedding and Nonalcoholic Fatty Liver Development In Vivo*. *Diabetes*, 2021. **70**(2): p. 577-588.
131. Molina, Y.L., et al., *Rottlerin Stimulates Exosome/Microvesicle Release Via the Increase of Ceramide Levels Mediated by Ampk in an In Vitro Model of Intracellular Lipid Accumulation*. *Biomedicines*, 2022. **10**(6).
132. Vilas-Boas, E.A. and A.J. Kowaltowski, *Mitochondrial redox state, bioenergetics, and calcium transport in caloric restriction: A metabolic nexus*. *Free Radic Biol Med*, 2024. **219**: p. 195-214.
133. Zhang, Y., et al., *Exercise and Metformin Intervention Prevents Lipotoxicity-Induced Hepatocyte Apoptosis by Alleviating Oxidative and ER Stress and Activating the AMPK/Nrf2/HO-1 Signaling Pathway in db/db Mice*. *Oxid Med Cell Longev*, 2022. **2022**: p. 2297268.
134. Papadakos, S.P., et al., *Interplay of Extracellular Vesicles and TLR4 Signaling in Hepatocellular Carcinoma Pathophysiology and Therapeutics*. *Pharmaceutics*, 2023. **15**(10).
135. Lisi, V., G. Senesi, and C. Balbi, *Converging protective pathways: Exploring the linkage between physical exercise, extracellular vesicles and oxidative stress*. *Free Radic Biol Med*, 2023. **208**: p. 718-727.
136. Neumann, C.A., J. Cao, and Y. Manevich, *Peroxiredoxin 1 and its role in cell signaling*. *Cell Cycle*, 2009. **8**(24): p. 4072-8.
137. Heaton, R.A., et al., *Peroxiredoxin 2 mediates redox-stimulated adaptations to oxidative phosphorylation induced by contractile activity in human skeletal muscle myotubes*. *Free Radic Biol Med*, 2025. **227**: p. 395-406.
138. Driedonks, T.A.P., M.K. Nijen Twilhaar, and E.N.M. Nolte-'t Hoen, *Technical approaches to reduce interference of Fetal calf serum derived RNA in the analysis of extracellular vesicle RNA from cultured cells*. *J Extracell Vesicles*, 2019. **8**(1): p. 1552059.
139. Yamashita, T., et al., *Effect of exosome isolation methods on physicochemical properties of exosomes and clearance of exosomes from the blood circulation*. *Eur J Pharm Biopharm*, 2016. **98**: p. 1-8.
140. Linares, R., et al., *High-speed centrifugation induces aggregation of extracellular vesicles*. *J Extracell Vesicles*, 2015. **4**: p. 29509.
141. Trosper, T.L. and K.D. Philipson, *Stimulatory effect of calcium chelators on Na^+ - Ca^{2+} exchange in cardiac sarcolemmal vesicles*. *Cell Calcium*, 1984. **5**(3): p. 211-22.
142. Wen, Z., et al., *A CaMKII/calcineurin switch controls the direction of Ca^{2+} -dependent growth cone guidance*. *Neuron*, 2004. **43**(6): p. 835-46.

8 ANNEXE

- Laemmli 5x :

Ingrédient	Quantité pour 35ml de solution
Tris base	0.51 g
SDS	0.04 g
H ₂ O déminéralisée	10 mL
Glycérol	10 mL
SDS 10%	10 mL
β -mercaptoéthanol	5 mL
Bleu de bromophénol 0.1%	17.5 mg

- Gel de polyacrylamide 1.5mm :

Ingrédient	Quantité pour 1 « Running gel »	Quantité pour 1 « Stacking gel 15% »
H ₂ O déminéralisée	3.4 mL	2.3 mL
Acrylamide mix 30%	0.830 mL	5.0 mL
Tris 1.5M (pH 8.8)	0.630 mL	2.5 mL
SDS 10%	50 μ L	100 μ L
Ammonium persulfate 10%	50 μ L	100 μ L
TEMED	5 μ L	10 μ L

- PBS :

Ingrédient	Quantité pour 1L de solution
NaCl	10 g
KCl	0.25 g
Na ₂ HPO ₄	1.44 g
KH ₂ PO ₄	0.25 g

- Milieu de prolifération :

	Si culture classique	Si collecte du milieu
Ingrédient	Quantité pour ~50mL de solution	
DMEM L0104 (High Glucose 4.5g/L, L-glutamine, avec Pyruvate de sodium)	39mL	39mL
Pénicilline-Streptomycine	Ajouté dans la bouteille au préalable	
Amphotéramine		
FBS	10 mL	10 mL (déplété en EVs)
Ultrosor G	250 μ L	250 μ L
HEPES (10 mM, pH 7.0)	0.5 mL	1 mL

- Milieu de différenciation :

	Si culture classique	Si collecte du milieu
Ingrédient	Quantité pour ~50mL de solution	
DMEM L0104 (High Glucose 4.5g/L, L-glutamine, avec Pyruvate de sodium)	49mL	49mL
Pénicilline-Streptomycine	Ajouté dans la bouteille au préalable	
Amphotéramine		
FBS	1 mL	1 mL (déplété en EVs)
HEPES (10 mM, pH 7.0)	/	0.5 mL

Contexte : Les vésicules extracellulaires (EVs), des structures membranaires libérées par les cellules, jouent un rôle clé dans la communication intercellulaire. Elles transportent diverses biomolécules. L'exercice physique influence leur libération, modifie leur nombre, leur contenu, notamment leur contenu antioxydant, et leur fonction. Ces EVs participent ainsi aux adaptations physiologiques induites par l'activité physique. Les objectifs étaient d'optimiser l'isolation d'EVs d'un milieu de culture et de caractériser les vésicules issues des myotubes humains contractés par stimulation électrique.

Méthode : L'isolation des vésicules extracellulaires a été réalisée par ultracentrifugation différentielle. Les EVs obtenus ont été caractérisés par l'analyse des marqueurs protéiques spécifiques via la western blotting.

Résultats : L'utilisation du rotor TLA-55 a montré plus de pureté et de rendement par rapport au rotor 70 Ti. L'électrostimulation des myotubes a induit une augmentation non significative des marqueurs vésiculaires et une augmentation significative de PRDX1 dans les EVs.

Conclusion : Cette étude apporte un modèle pour l'étude des EVs du muscle squelettique. De plus, l'augmentation du contenu antioxydant des vésicules extracellulaires observée après l'exercice in vivo semble en partie provenir du muscle squelettique, notamment avec l'augmentation de la PRDX1, régulateur potentiel de la réponse antioxydante dans d'autres tissus et moduler le stress oxydatif systémique.