2015-2016

**Master 1 Mouvement, Sport, Santé**

# Mise en place d'un système de stimulation électrique de cellules musculaires afin de mimer l'activité physique *in vitro*




Mémoire de **Joaquim GRIMAUD**

Tutrice universitaire et encadrante du projet: **Amélie REBILLARD**

Préparé au laboratoire Mouvement, Sport, Santé M2S (EA1274, Rennes)

**L'auteur du présent document vous autorise à le partager, reproduire, distribuer et communiquer selon les conditions suivantes :**

- Vous devez le citer en l'attribuant de la manière indiquée par l'auteur (mais pas d'une manière qui suggérerait qu'il approuve votre utilisation de l'œuvre).

- Vous n'avez pas le droit d'utiliser ce document à des fins commerciales.

- Vous n'avez pas le droit de le modifier, de le transformer ou de l'adapter.

Consulter la licence creative commons complète en français :
http://creativecommons.org/licences/by-nc-nd/2.0/fr/

RÉSUMÉ

L'objectif de ce mémoire est de mettre en place et de valider un protocole d'électrostimulation *in vitro*, "Electrical pulse stimulation" (EPS) de myotubes murins C2C12 en culture qui permette de mimer l'activité physique (AP) chronique d'intensité modérée et ses effets in vivo.

Il est possible de compléter cet objectif d'une part en établissant une méthode permettant de vérifier que les myotubes que l'ont souhaite électrostimuler sont complètement différenciés et sont capables d'avoir une réponse contractile, d'autre part, en vérifiant que les modifications induites par le programme EPS choisi reflètent bien les effets de l'AP que l'on souhaite imiter. Ces vérifications reposent sur l'analyse de différents biomarqueurs intra- ou extracellulaires.

A terme, ce protocole devrait permettre de pouvoir récupérer le sécrétome de myotubes électrostimulés, qui contient un grand nombre de facteurs différents, afin d'en étudier les effets sur différentes lignées de cellules tumorales (côlon, sein ou prostate) en culture et ainsi permettre de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans les effets anti-prolifératifs de l'AP sur certains cancers.

**Mots-clés:** Myotubes, lignée C2C12, électrostimulation *in vitro* (EPS), cancers, myokines

ABSTRACT

The overall goal of this master's thesis is to develop and validate an *in vitro* electrostimulation protocol, "Electrical pulse stimulation" (EPS) of C2C12 myotubes in culture which enables to mimic moderate intensity of physical activity (PA) and its *in vivo* effects.

Firstly, It is possible to complete this objective by establishing a method for checking complete differenciation and contractil response of myotubes before starting EPS protocol. Secondly, by making sure that the EPS-induced modifications reflect the effects of mimicked PA. These verifications are based on multiple intra- or extracellular biomarkers analysis.

Such protocol should allow to harvest a secretome from electrostimulated myotubes containing a wide variety of factors. These factors could then be isolated and used to study their effects on different tumor cell lines (colon, breast or prostate) in culture. Such process will allow to improve the state of knowledge on the molecular mechanisms involved in the antiproliferative effects of PA on various cancers.

**Keywords:** Myotubes, C2C12 cell line, Electrical pulse stimulation (EPS), cancers, myokines

# REMERCIEMENTS

Mes remerciements vont tout d'abord à Amélie Rebillard pour ses précieux conseils, sa relecture avisée et son engouement très communicatif pour la recherche.

Je remercie toute l'équipe du laboratoire M2S pour m'avoir accueilli et les membres du jury pour l'attention portée à ce mémoire.

Je tiens également à remercier Prof. Bente Klarlund Pedersen et son assistante personnelle Rikke Frederiksen, Dr. Daisy van der Schaft et Ariane van Spreeuwel de l'université technologique de Eindhoven (Pays-Bas) ainsi que Prof. Mark Febbraio (Garvan Institute of Medical Research) qui ont généreusement accepté de m'envoyer par mail certains de leurs travaux.

Merci et à toi Corentine pour nous avoir autant diverti avec tes intarissables questions de syntaxe et à toi Manu pour avoir si bien su placer les pauses café. Merci aussi Alex, Elodie, Cindy et Carole pour cette bonne ambiance de travail durant ces dernières semaines bien fastidieuses.

Merci à ma famille et à mon coeur pour leur soutien.

# SOMMAIRE


**Liste des abréviations** **6**
**Table des figures et des tableaux** **9**
**Introduction** **10**
**Revue de littérature** **12**
1. Activité physique et progression des cancers 12
1.1. Inactivité physique et cancers 12
1.2. AP et préventions des cancers 12
1.3. Effets de l'AP sur les mécanismes liés à la progression tumorale 14
1.3.1. Insuline et insulino-résistance 15
1.3.2. Masse grasse et adipokines 17
1.3.3. Processus inflammatoire 17
1.3.4. Apoptose et marqueurs de l'apoptose 19
1.3.5. Stress oxydant 19
1.4. Production de myokines durant l'AP et effets sur les cancers 21
2. Modèles animaux pour l'étude des effets de l'AP in vivo 24
3. Mimer l'AP in vitro 25
3.1. Description du système EPS 26
3.2. Lignées cellulaires et méthodes de culture utilisées 27
3.3. Différenciation des myotubes 29
3.4. Les différents modèles et paramètres EPS 30
3.5. Limites rencontrées dans les modèles EPS 35
**Synthèse et objectifs** **38**
**Protocole proposé** **39**
1. Culture cellulaire 39
2. Vérification de la différenciation des myoblastes en myotubes 40
3. Stimulation EPS 41
4. Analyse du contenu des myotubes et du MC après stimulation EPS 41
4.1. Détection et dosage de l'IL-6 par méthode ELISA 41
4.2. Mesure de l'activité enzymatique de la citrate synthase 42
5. Dosage des protéines et Western-Blots 43
7. RT-qPCR 44
9. Analyses statistiques 45
**Résultats attendus** **47**
**Conclusion et perspectives** **48**
**Références bibliographiques** **49**
**Annexes** **53**

# Liste des abréviations

| | |
|---|---|
| **2-DG** | 2-Deoxy-D-glucose, déoxyglucose |
| **5-LO** | 5-lipoxygenase |
| **Ac** | Anticorps |
| **aGnRH** | Agoniste de la gonadolibérine |
| **AICAR** | 5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucléotide, également appelée *"Acadésine"* |
| **AMP** | Adénosine monophosphate |
| **AMPc** | Adénosine monophosphate cyclique |
| **AMPK** | Protéine kinase activée par l'AMP |
| **AOM** | Azoxyméthane |
| **AP** | Activité physique |
| **ARNm** | Acide ribonucléique messager |
| **ATP** | Adénosine triphosphate |
| **ATPsyn** | ATP synthase |
| **Av** | Avidine |
| **Bax** | *"Bcl-2–associated X protein"*, protéine X associée à Bcl-2 |
| **Bcl-2** | *"B-cell lymphoma 2"*, protéine 2 de lymphome à lymphocyte B |
| **b-FGF** | *"Basic fibroblast growth factor"*, facteur de croissance des fibroblastes basique |
| **BSA** | "Bovine serum albumin", Albumine bovine sérique |
| **$Ca^{2+}$** | Calcium |
| **CHI3L1** | *"Chitinase-3-like protein 1"*, protéine chitinase 3-like 1 |
| **CNTF** | *"Ciliary neurotrophic factor"*, facteur neurotrophique ciliaire |
| **COX** | Cyclo-oxygénase |
| **CPT1B** | Carnitine palmitoyltransferase 1B musculaire |
| **CRP** | *"C-reactive protein"*, protéine C réactive |
| **CS** | Citrate synthase |
| **CT-1** | Cardiotrophine 1 |
| **CYCS** | Cytochrome c somatique |
| **DE** | Dépense énergétique |
| **DMEM** | *"Dulbecco's Modified Eagle's Minimal Essential Medium"*, milieu de culture minimum essentiel de Dulbecco |
| **EAPA** | Enseignant ou éducateur en activité physique adaptée |
| **ELISA** | *"Enzyme-linked immunosorbent assay"*, dosage d'immunoabsorption par enzyme liée |
| **EMS** | Electro-myostimulation, stimulation musculaire électrique |
| **EMT** | *"Epithelial to mesenchymal transition"*, transition épithélio-mésenchymateuse |
| **EPS** | *"Electrical Pulse Stimulation"*, stimulation de cellules par impulsion électrique |
| **ERK** | *"Extracellular signal-regulated kinase"*, kinase extracellulaire régulée par un signal |
| **FBS** | Sérum foetal bovin inactivé par la chaleur |
| **FCS** | *"Fetal Calf Serum"*, Sérum de veau foetal (SVF) |
| **FT** | *"Fast-twich"*, fibres musculaires de type rapides et glycolytiques |
| **GAPDH** | Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase |

| | |
|---|---|
| **GLUT1/4** | Transporteur de glucose de type 1 ou 4 |
| **GYS** | Glycogène synthase |
| **H2O2** | Peroxyde d'hydrogène |
| **HK2** | Hexokinase 2 |
| **HPRT1** | Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase 1 |
| **HRP** | *"Horseradish peroxidase"*, peroxydase de raifort |
| **HS** | Sérum de cheval |
| **IGF-1** | *"Insulin-like growth factor-1"*, facteur de croissance 1 ressemblant à l'insuline, encore appelé somatomédine C |
| **IGFBP** | *"Insulin-like growth factor-binding protein"*, protéines de séquestration des récepteurs de l'IGF |
| **IL-6** | Interleukine-6 |
| **IL-11** | Interleukine-11 |
| **IMC** | Indice de masse corporelle |
| **JAK** | *"Janus kinase"* |
| **LIF** | *"Leukemia inhibitory factor"*, facteur inhibiteur de leucémie |
| **LNK** | Lymphocyte *natural killer* |
| **MC** | Milieu conditionné |
| **MCAD** | *"Medium-chain acyl-Coenzyme A dehydrogenase"*, acyl-Coenzyme A déshydrogénase des acides gras à chaîne moyenne |
| **MEC** | Matrice extracellulaire |
| **MEF2** | *"Myocyte enhancer factor 2"*, facteur-2 musculaire activateur de la transcription |
| **MEK** | *"Mitogen-activated protein kinase kinase"*, aussi MAPKK, kinase de protéine kinase activée par des mitogènes (MAPK) |
| **MET** | *"Metabolic Equivalent of Task"*, équivalent métabolique pour une tâche donnée |
| **MyHC** | *"Myosin heavy chain"*, chaîne lourde de myosine |
| **MLP** | *"Muscle lim protein"*, protéine des muscles des membres inférieurs |
| **MRF** | *"Myogenic regulatory factors"*, facteurs de régulation myogéniques |
| **MSS** | Muscle strié squelettique |
| **Myf** | *"Myogenic factor"*, facteur myogénique |
| **Myf-4** | *"Myogenic factor 4"*, facteur myogénique 4, myogénine |
| **Myf-6** | *"Myogenic factor 6"*, facteur myogénique 6, herculine, Mrf4 |
| **MYH** | *"Myosin, heavy chain"*, famille de gènes qui encodent les différentes isoformes de chaîne lourde de myosine |
| **MyoD** | *"Myogenic differentiation factor"*, facteur de différenciation myogénique |
| **NOX** | NADPH oxydase du sarcolemme |
| **OMS** | Organisation mondiale de la Santé, "world health organization" (WHO) |
| **OSM** | Oncostatine M |
| **P/S** | Pénicilline et streptomycine |
| **PBS** | "Phosphate-buffered saline", tampon phosphate salin |
| **PCr** | Phosphocréatine, créatine phosphate |
| **PDGF** | *"Platelet-derived growth factor"*, facteur de croissance dérivé des plaquettes |

| | |
|---|---|
| **PDK4** | *"Pyruvate dehydrogenase kinase isoform 4"*, isoforme 4 de la pyruvate deshydrogénase kinase |
| **PGC-1α** | *"Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1-α"* (PPARGC1A), coactivateur 1 α du récepteur γ activé par les proliférateurs de peroxysomes (PPARγ) |
| **PPARγ** | Récepteur gamma activé par les proliférateurs de peroxysomes |
| **pré-ARNm** | Acide ribonucléique messager simple brin immature précurseur |
| **RE** | Réticulum endoplasmique |
| **ROS** | *"Reactive oxygen species"*, espèces réactives dérivées de l'oxygène |
| **RPLPo** | *"Ribosomal protein lateral stalk subunit P0"*, gène d'une protéine constitutive de la grande sous-unité 60S du ribosome |
| **RT-qPCR** | *"Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction"*, Réaction en chaîne par polymérase quantitative couplée à la transcription inverse |
| **SDH** | Succinate deshydrogénase |
| **SDS-PAGE** | *"Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis"*, électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium |
| **SO** | Stress oxydant |
| **SPARC** | *"Secreted protein which is acidic and rich in cystein"*, protéine sécrétée, acidique et riche en cystéine, ostéonectine |
| **ST** | *"Slow-twich"*, fibres musculaires de type lentes et oxydatives |
| **STAT** | *"Signal transducer and activator of transcription"* |
| **TBS** | *"Phosphate buffered saline"* , tampon phosphate salin |
| **TGF-β** | *"Transforming growth factor beta"*, Facteur de croissance transformant beta |
| **TNF-α** | *"Tumor necrosis factor α"*, facteur de nécrose tumorale α |
| **UCP3** | *"Mitochondrial uncoupling protein 3"*, protéine découplante mitochondriale 3 |
| **VEGF** | *"Vascular endothelial growth factor"*, facteur de croissance de l'endothélium vasculaire |
| **WB** | Western-blot |
| **XO** | Xanthine oxydase |

# Table des figures et des tableaux

**Figures:**


| | |
|---|---|
| **Figure 1** | Voies de signalisation de l'insuline et de l'IGF-1 |
| **Figure 2** | Voie de signalisation de l'IL-6 |
| **Figure 3** | Stimulateur électrique de cellules en culture |
| **Figure 4** | Design de la démarche expérimentale |
| **Figure 5** | Protocole de culture et de différenciation des myocytes C2C12 |


**Tableaux:**


| | |
|---|---|
| **Tableau 1** | Profils d'expression géniques correspondant aux différentes étapes de la myogenèse |
| **Tableau 2** | Les types d'exercices imités par Burch et al. avec le système EPS |
| **Tableau 3** | Les programmes EPS proposés par Nikolić et al. et leurs effets sur les myotubes |
| **Tableau 4** | Anticorps primaires utilisés pour les WB |
| **Tableau 5** | Amorces utilisées pour les RT-qPCR |


**Annexes:**


| | |
|---|---|
| **Tableau I** | Les différentes myokines actuellement connues |
| **Tableau II** | Comparaison des temps et des milieux de croissance entre les différents protocoles évoqués dans la revue de littérature |
| **Tableau III** | Comparaison des temps et des milieux de différenciation entre les différents protocoles évoqués dans la revue de littérature |
| **Tableaux IV à VIII** | Comparaison des paramètres EPS utilisés entre les différents protocoles évoqués dans la revue de littérature |
| **Tableau IX** | Les différents types de fibres des MSS |

# Introduction

En 2012, selon l'OMS, les cancers représentaient la seconde cause de mortalité dans le monde, parmi les maladies non transmissibles (8 millions de morts, 22% des décès par maladies non transmissibles). Les projections des épidémiologistes indiquent que les cancers devraient rester l'une des principales causes de mortalité au moins jusqu'en 2030 **(Ott et al. 2011 ; White et al. 2014)**. Face à la recrudescence des cancers, de nouvelles stratégies de lutte et de prévention sont recherchées et développées. Certaines études évoquent des effets bénéfiques de l'activité physique (AP) permettent de lutter contre certains types de cancers **(Bachmann et al. 2015)**. L'AP, telle que définie par l'OMS, englobe les loisirs, les déplacements, les activités professionnelles, les tâches ménagères, le jeu, les sports ou l'exercice planifié. Elle est ainsi définie comme tout mouvement corporel produit par les muscles striés squelettiques (MSS) qui engendre une dépense énergétique (DE). L'AP, en plus d'améliorer la survie et la qualité de vie des patients en luttant contre la cachexie cancéreuse, pourrait prévenir jusqu'à 25% des cancers, notamment du côlon, de la prostate et du sein. Elle présente de plus l'avantage d'être accessible à presque toute la population **(Desnoyers et al. 2016)**. Dans le milieu médical, l'AP a ainsi de plus en plus tendance à être prescrite comme adjuvant au traitement de nombreuses pathologies. Dans ce cadre, on parle alors d'AP adaptée (APA).

l'APA est définie par De Potter comme "tout mouvement, activité physique et sport, essentiellement basé sur les aptitudes et les motivations des personnes ayant des besoins spécifiques qui les empêchent de pratiquer dans des conditions ordinaires" **(De Potter 2004)**. L'APA désigne donc toute AP proposée à une population particulière et qui est ajustable à chaque individu selon sa pathologie, les conditions de son hospitalisation, son âge et son état général. Depuis seulement quelques année en France, l'APA fait partie intégrante des soins de support. Les soins de support regroupent toutes les formes d'interventions de soin et de soutien qui sortent du champ des pratiques médicales et hospitalières. Ces pratiques visent à améliorer la qualité et l'espérance de vie des patients. D'après les 2 premiers plans cancer (2003-2007 et 2009-2013), elles doivent être menées conjointement aux soins médicaux classiques. Elles viennent compléter et enrichir l'offre et la qualité des soins. L'APA-Santé repose ainsi sur la prise en charge de publics à besoins spécifiques au moyen de programmes d'activités physiques ou sportives adaptées. Pour se mettre en place, ces programmes d'exercices doivent passer par des phases de diagnostic, de conception, de mise en œuvre, d'évaluation, de suivi, puis de développement. Toute démarche en APA-Santé s'intègre dans un projet de prévention. Cette prévention est dite "primaire" si elle vise à réduire ou à éliminer les pathologies avant leur apparition, "secondaire" si elle vise à lutter contre une ou plusieurs pathologies durant la prise en charge médicale et "tertiaire" si elle est mise en place après rémission, par exemple pour limiter le risque de récidive **(Desnoyers et al. 2016)**. En France, malgré une littérature de plus en plus fournie sur le sujet et une trentaine d'années d'enseignement universitaire, les prescriptions d'AP par les médecins restent rares, mal adaptées et peu efficaces **(Bernard, Romain, et Vergnault 2015)**. Afin d'améliorer cette situation, Bernard et al. préconisent d'une part une intégration plus importante des enseignants en APA au sein des équipes hospitalières et d'autre part une collaboration entre médecins et enseignant-chercheurs en APA afin d'améliorer la compréhension des mécanismes impliqués. Le troisième plan cancer

(2014-2019) souligne également l'importance de la sensibilisation des professionnels de santé et des patients aux dangers de la sédentarité et à l'intérêt de renforcer ou de maintenir une AP après un diagnostic de cancer. L'APA est une approche qu'il faut préconiser chez les patients atteints d'un cancer, et ce quel que soit le stade de la maladie. L'AP de droit commun pour sa part devrait être favorisée avant et après la fin de traitements.

Dans le modèle humain, les études qui se penchent sur les effets de l'AP vis à vis de pathologies sont toutes réalisées *in vivo*. Ces protocoles, malgré le fait qu'ils présentent l'avantage d'être assez proches de la clinique, ne permettent pas d'étudier les processus ainsi que les molécules intrinsèques et extrinsèques des MSS. Par exemple, les prises de sang ne permettent pas de déterminer par quels types de cellules les facteurs relargués dans la circulation sanguine ont été sécrétés et seules des biopsies musculaires permettent d'obtenir ce genres de données, mais ces dernières sont beaucoup trop invasives. Ils n'offrent pas non plus la possibilité d'étudier séparément les types cellulaires et leurs sécrétomes respectifs. Les modèles d'étude *in vitro* présentent quant à eux l'avantage de permettre l'analyse du sécrétome musculaire tout en isolant un type cellulaire ou un organe afin d'en étudier précisément les rôles. Le recours à ces modèles *in vitro* permet notamment d'identifier les mécanismes moléculaires activés en réponse à l'AP qui sont responsables de ses bienfaits. Dans ces modèles, les myotubes en culture sont capables d'avoir une réponse contractile en réponse à des stimuli électriques. Il a effectivement été démontré que des programmes de stimulation électrique "Electrical pulse stimulation" (EPS) permettent de mimer les effets de l'AP sur des myotubes humains en culture **(Nikolić et al. 2012)** et murins **(Gogh et al. 2015)**. La culture cellulaire offre donc la possibilité d'étudier plus finement les mécanismes mis en oeuvre et les molécules intrinsèques et extrinsèques produites par les myotubes lors d'une stimulation électrique mimant l'exercice **(Burch et al. 2010)**. En plus de faciliter la mise en place de protocoles de biologie cellulaire et moléculaire, l'approche "*in vitro*" possède également d'autres avantages par rapport au "*in vivo*", elle est plus rapide à mettre en place, plus reproductible et moins onéreuse.

Après la mise en place d'un protocole EPS avec des paramètres clairement définis et basés sur une revue critique des différents paramètres retrouvés dans la littérature, il sera effectivement envisageable de traiter différentes lignées de cellules cancéreuses avec le milieu de culture des myocytes électrostimulés. Cela permettra d'étudier l'effet du myokinome sur des lignées de cellules cancéreuses cultivées *in vitro* et aussi d'effectuer un screening sur un large panel de lignées afin d'avoir une vue d'ensemble des effets potentiels de ce type de traitement. A terme, l'objectif final est d'amener des connaissances permettant d'améliorer la qualité et la pertinence des prescriptions d'APA pour des patients atteints de cancers.

# Revue de littérature

## 1. Activité physique et progression des cancers

### 1.1. Inactivité physique et cancers

L'inactivité physique est un terme utilisé pour identifier les personnes qui n'atteignent pas les niveaux d'AP quotidienne recommandés **(Gratas-Delamarche et al. 2014)**. L'OMS considère qu'une personne est inactive physiquement lorsque qu'elle consacre moins de 5x30 min à une AP d'intensité modérée, i.e. comprise entre 3 et 6 MET par heure (MET-h), par semaine, ou moins de 3x20 minutes d'AP vigoureuse, i.e. à partir de 6 MET-h, par semaine. L'inactivité physique est responsable de l'augmentation du risque d'un large spectre de pathologies dont les symptômes apparents sont très variés, elle est d'ailleurs actuellement considérée comme le 4ème facteur de risque de mortalité dans le Monde, c'est pourquoi il est important de développer des critères permettant de définir clairement ce qu'est l'inactivité physique afin de pouvoir ensuite envisager et établir des stratégies d'intervention. Il convient également de distinguer inactivité physique et comportement sédentaire, le temps de sédentarité étant le temps passé assis. Il est aujourd'hui bien démontré que toutes les maladies liées à l'inactivité physique ont en commun les mêmes facteurs déclencheurs, comme l'insulino-résistance, l'inflammation et le stress oxydant (SO) **(Pedersen 2009)**. Qui plus est, ces processus ne sont pas indépendants les uns des autres, ils s'influencent mutuellement, ce qui rend extrêmement complexe la compréhension des mécanismes initiant ces dérèglements physiologiques. Afin d'explorer ces mécanismes, des efforts ont été fait pour développer différents modèles d''inactivité physique chez l'Homme et chez les rongeurs. Le modèle d'inactivité physique le plus souvent utilisé chez l'Homme est l'expérience de "bed rest", qui consiste en un alitement sur une durée prolongée, et chez les rongeurs il s'agit du test de suspension par la queue qui permet de délester leur arrière-train **(Gratas-Delamarche et al. 2014)**.

L'inactivité physique, via l'émergence ou l'amplification de l'insulino-résistance sur le long terme, augmenterait le risque de cancer du sein **(Friedenreich 2011)**, colorectal **(Friedenreich et al. 2006)**, du foie, du pancréas **(Gratas-Delamarche et al. 2014)** et de l'endomètre **(Pedersen 2009)**. Les rôles que joue l'inactivité physique dans le développement des cancers ont été peu étudiés et probablement sous-estimés **(Courneya et Friedenreich 2011)**. Toutefois, d'après Friedenreich, les cancers sont aujourd'hui acceptés comme des maladies liées au mode vie et la communauté médicale accorde de plus en plus de crédit à la recherche sur le lien inactivité physique et cancers. Cette recherche s'est accompagnée par le développement de différentes stratégies de prévention.

### 1.2. AP et préventions des cancers

En prévention primaire, l'OMS recommande clairement à la population générale d'effectuer un minimum de 150 minutes d'AP d'endurance par semaine si l'intensité est modérée ou 75 minutes si l'intensité est soutenue, fractionné ou non par périodes minimales

de 10 minutes. l'AP d'intensité modérée devrait même être augmentée à 300 minutes par semaine et l'activité soutenue à 150 minutes par semaine afin de maximiser les bénéfices sur la santé **(Khan et al. 2012)**. L'objectif est de lutter contre les facteurs de risques. Des habitudes de vie saines, combinant une bonne alimentation et une AP régulière sont par exemple associées à un risque de cancer plus faible chez des femmes post-ménopausées **(Desnoyers et al. 2016)**. Dans l'étude évoquée par Desnoyers et al., le risque est diminué de 17% pour tous cancers confondus, de 22% pour le cancer du sein et de 52% pour le cancer du côlon. Pour le cancer du sein, première cause de cancer chez la femme dans le monde, la prévention primaire est essentielle **(Ott et al. 2011)**. Il s'agit du cancer dans lequel l'AP apporte la plus grande diminution du risque en pré-diagnostic, entre 15 et 20%, avec un maximum d'efficacité observé chez les femmes avec un IMC supérieur à 25 et en post-ménopause. Pour le cancer du côlon, distal ou proximal, deuxième cancer chez la femme et le troisième chez l'homme en terme d'incidence, la réduction du risque lié à la pratique d'une AP est estimé à 24% **(Desnoyers et al. 2016)**. Dans le cadre d'une prévention primaire, l'AP constituerait aussi une stratégie intéressante contre le cancer de l'estomac, cinquième cancer le plus fréquent à l'échelle mondiale et le troisième en terme de mortalité **(Ott et al. 2011)**, le cancer de l'oesophage, de la vessie, des poumons ainsi que les cancers pelviens **(Desnoyers et al. 2016)**. De plus, l'obésité est un facteur de risque des cancers les plus fréquents. L'AP permettrait également de diminuer le risque de cancer en diminuant la surcharge adipeuse. Cet effet a surtout été documenté chez les populations à haut risque **(Bachmann et al. 2015)**. Il ressort des différentes études que l'intensité du programme d'AP, sa fréquence et sa durée sont déterminants sur la réduction des risques de cancer.

En prévention secondaire, l'AP est aussi mise en exergue comme étant un moyen susceptible de lutter contre les effets secondaires indésirables associés aux traitements du cancer via ses impacts potentiels sur le poids corporel et sur des marqueurs biologiques inflammatoires, immunitaires et hormonaux. L'objectif est de favoriser l'autonomie des patients. L'AP post-diagnostic est associée à un risque de mortalité inférieur dans le cancer colorectal et le cancer de la prostate. Mais aucune association n'a par contre pu être démontrée dans les cancers pelviens et hématologiques. En ce qui concerne le cancer du poumon, aucun effet bénéfique n'a été observé, sauf concernant la réhabilitation péri-opératoire et chez des patients à un stade avancé **(Desnoyers et al. 2016)**. De plus, la prescription d'AP en prévention secondaire des cancers n'est pas forcément compatible avec l'ensemble des traitements.

En ce qui concerne la prévention tertiaire, le nombre de survivants à long terme d'un cancer, c'est à dire les personnes qui sont toujours en vie plus de 5 ans suite au diagnostic continue de croître. Ces dernières s'intéressent de plus en plus à toutes les modifications dans leurs habitudes quotidiennes qui peuvent permettre de prolonger leur espérance de vie, dont l'AP **(Desnoyers et al. 2016)**. Les études sur le cancer du sein sont celles qui montrent l'association inverse entre pratique d'AP et risque de récidive la plus significative **(Carayol 2013)**. Presque toutes les études actuellement publiées concluent qu'une AP débutée avant ou après le diagnostic engendre une diminution du risque de mortalité.

L'association entre l'AP et ses effets bénéfiques sur les cancers est de plus en plus établie, néanmoins, l'influence du type, de l'intensité et de la fréquence de l'AP n'ont pas encore été clairement étudiés à l'heure actuelle. Quelques études permettent d'apporter des éléments de réponse pour certains cancers. En prévention primaire, pour les cancers gastro-oesophagiens, la réduction du risque est plus importante quand l'AP est d'intensité modérée à intense et qu'elle s'effectue à une fréquence de 5 fois par semaine **(Desnoyers et al. 2016)**. En prévention tertiaire, les survivants de cancer qui réalisent un entraînement en résistance, mettant en oeuvre la capacité de répéter et soutenir longtemps un effort d'intensité moyenne, au moins une fois par semaine présentent une réduction de mortalité toute causes confondues de 33% **(Desnoyers et al. 2016)**. L'entraînement en résistance recouvre un ensemble d'exercices qui permettent un renforcement musculaire par augmentation de la masse, de la puissance, de l'endurance et de la force des MSS. De plus, les bénéfices sur la survie pour une même fréquence et intensité d'AP varient beaucoup en fonction du site tumoral. La grande hétérogénéité d'AP retrouvée dans la littérature fait qu'il n'y a toujours pas de consensus clair sur le type d'AP à recommander aux patients. Les futures études mériteraient que le type d'AP sur lequel elles se penchent et les moyens d'évaluation qu'elles utilisent soient homogénéisés et standardisés. Les consensus sont d'autant plus difficiles à trouver que les limitations intrinsèques aux patients doivent être prises en compte. Le type d'AP proposé en APA doit être individualisé, s'adapter aux capacités physiques, aux préférences du patient ainsi qu'aux particularités de sa maladie. Néanmoins, il ressort actuellement que les effets positifs semblent surtout liés à l'AP d'intensité modérée à soutenue **(Desnoyers et al. 2016)**. Effectivement, les prises en charge actuellement proposées alternent le plus souvent reconditionnement physique et entraînement à l'effort. En général, en prévention secondaire de cancer, l'éducateur en APA (EAPA) préconise une activité aérobie modérée à soutenue, qui varie entre 10 et 60 minutes, à raison de 2 à 5 fois par semaine.

De nombreuses études cliniques observationnelles ont décrit des effets bénéfiques et préventifs de l'AP contre les cancers. La liste des mécanismes moléculaires et physiologiques qui permettent d'expliquer comment une AP régulière est capable de prévenir les rechutes ou la mortalité liées au cancer est grandissante. Cependant ces derniers sont encore méconnus et méritent d'être davantage décryptés que ce qui a été fait à l'heure actuelle. Malheureusement, l'approche des d'études citées plus haut ne permet pas de les étudier. Pour surmonter ces difficultés, des études ont mesuré les biomarqueurs associés au risque de cancer afin de déterminer les relations de causalité entre l'AP et les cancers. Cela permet ainsi d'une part de mieux comprendre les voies de signalisation impliquées, d'autre part de cerner les doses optimales d'AP, type, durée, fréquence, et intensité requises pour modifier ces mécanismes **(Winzer et al. 2011)**.

## 1.3. Effets de l'AP sur les mécanismes liés à la progression tumorale

L'AP agirait via la modulation de différents mécanismes afin de ralentir ou diminuer la prolifération tumorale. Ces mécanismes sont la sécrétion d'insuline et l'insulino-résistance, la production et la biodisponibilité des hormones stéroïdes sexuelles, les variations de masse grasse et de concentration des adipokines, la fonction immunitaire, l'inflammation chronique, ainsi que les processus apoptotiques. **(Winzer et al. 2011 ; Desnoyers et al.**

**2016)**. Il apparaît que le SO est également impliqué. L'ensemble de ces processus s'influencent les uns avec les autres, ce qui rend extrêmement complexe leur analyse et leur compréhension. Parmi ces pistes, celles qui sont actuellement les plus explorées touchent aux rôles des cellules adipeuses, des hormones, des facteurs de croissance, de l'immunité et des marqueurs inflammatoires **(Carayol 2013)**.

### 1.3.1. Insuline et insulino-résistance

Une partie de ces effets passent par une stabilisation et une diminution de la surcharge adipeuse. En effet, les mécanismes physiopathologiques favorisant la croissance tumorale en lien avec l'obésité sont aujourd'hui bien documentés, il s'agit de l'insulino-résistance, de l'inflammation et du dérèglement de la production des hormones stéroïdiennes sexuelles **(Bachmann et al. 2015)**. Chez la femme en surpoids, inactive et post-ménopausée, l'AP a un effet faible à modéré sur la réduction de l'insulinémie à jeun, de l'insulino-résistance et de la concentration de leptine. Une diminution des taux d'insuline sanguine à jeun est susceptible d'être cliniquement important. En effet, des concentrations élevées d'insuline ont été associés à une multiplication par 2 voire 3 du risque de cancer du sein. Cette hormone est un puissant agent mitogène pour les cellules tumorales du cancer du sein. Des concentrations élevées sont également associées à un risque accru de récidive à long terme et de décès, indépendamment de l'IMC. Une diminution de 20-25% de la concentration en insuline augmenterait effectivement le taux de survie 5 ans après le diagnostic du cancer du sein de 5-6% **(Winzer et al. 2011)**. Il a été proposé que l'AP pourrait protéger contre la récidive du cancer du sein en réduisant les concentrations d'insuline par l'intermédiaire d'une augmentation de la quantité et du fonctionnement des transporteurs transmembranaires de glucose comme GLUT4, ce qui améliore la clairance des acides gras libres et augmente l'activité enzymatique mitochondriale **(Winzer et al. 2011)**. Un taux élevé d'insuline est également associé au cancer du côlon. Bien que peu d'études aient été menées, certaines données mettent en évidence un rôle de l'AP dans la modulation d'autres biomarqueurs qui sont dérégulés dans ces deux cancers. Parmi ces marqueurs on peut citer la leptine, les oestrogènes ainsi que des marqueurs de l'apoptose et de l'adiposité. Il semblerait par exemple que chez les survivants de cancer du sein l'AP augmente certains facteurs comme des protéines impliquées dans la voie de signalisation de la somatomédine C (IGF-1), dans le fonctionnement du système immunitaire, dans l'inflammation et sans doute aussi dans la voie métabolique de l'insuline **(Winzer et al. 2011)**. L'AP permettrait ainsi de diminuer la concentration d'IGF-1 et de leptine. L'IGF-1 est, comme l'insuline, un mitogène puissant dans le cancer du sein, de fortes concentrations sont associées à un risque accru de rechute. Des études *in vitro* ont montré qu'IGF-1 a des actions anti-apoptotiques et pro-angiogéniques. D'après des études épidémiologiques, l'association entre IGF-1 et taux de récidive est davantage marquée chez des patientes pré-ménopausées. Néanmoins il a aussi été montré que l'AP réduit significativement la concentration d'IGF-1 et d'IGF-2 chez des femmes post-ménopausées ayant survécu à un cancer du sein **(Winzer et al. 2011)**. De fortes concentrations de protéines de séquestration des récepteurs de l'IGF (IGFBP) sont considérés comme bénéfiques car elles réduisent la biodisponibilité de l'IGF-1. De ce fait, elles sont théoriquement censées diminuer le risque de cancer. Toutefois, les études concernant l'effet de l'AP sur ces protéines ne sont pas concordantes. De plus, des études cliniques suggèrent que des concentrations élevées

d'IGFBP-3 peuvent augmenter le risque de récidive à long terme du cancer du sein positif pour le récepteur à l'oestrogène (ER+) chez des femmes en post-ménopause. Ces effets néfastes de l'IGFBP-3 devraient être davantage étudiés (**Winzer et al. 2011**).

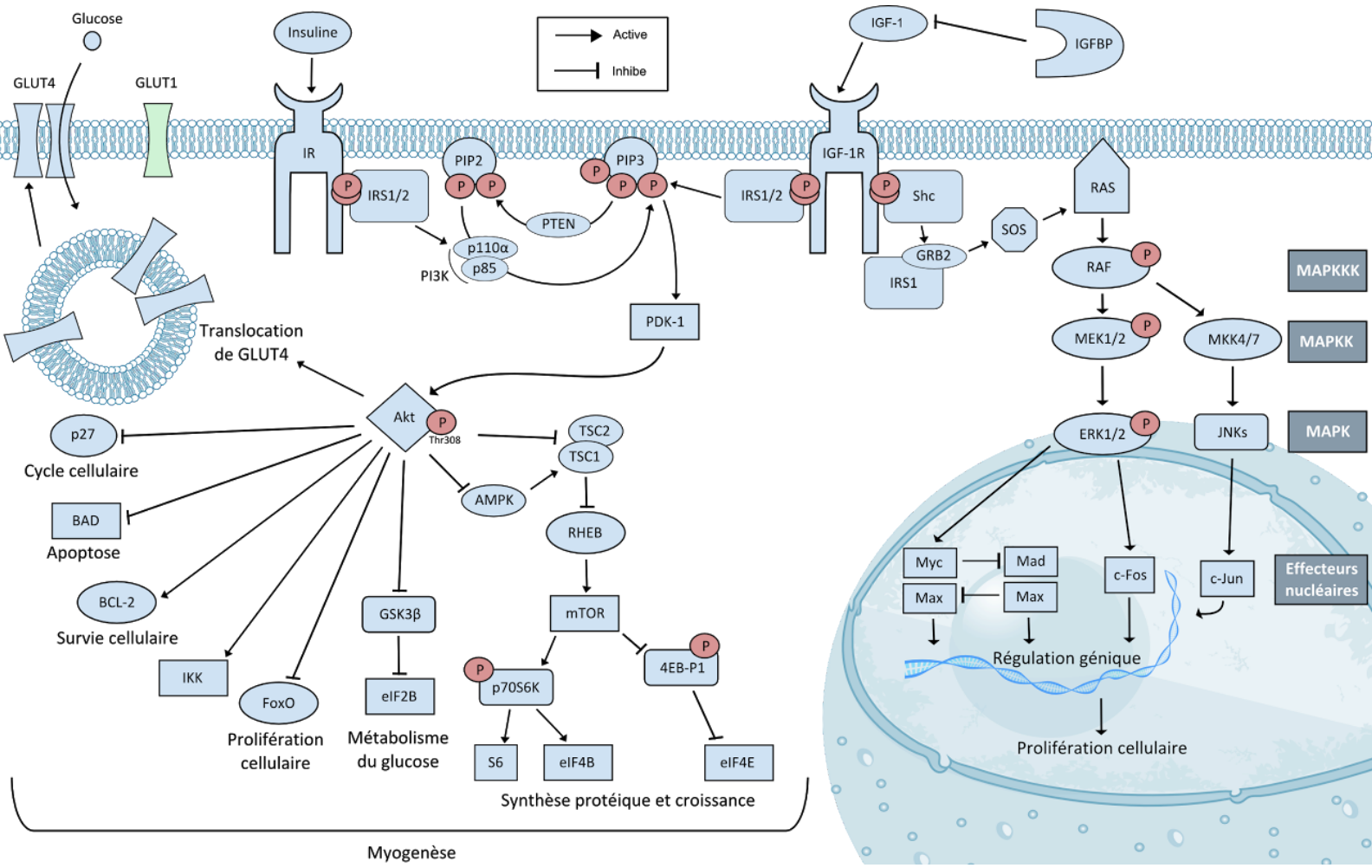



**Figure 1: Voies de signalisation de l'insuline et de l'IGF-1**

**IR**: Récepteur de l'insuline ; **IRS-1/2**: Substrat 1/2 du récepteur à l'insuline ; **PIP2/3**: Phosphatidylinositol bis/tri-phosphate ; **PI3K**: Protéine kinase des phosphoinositides, i.e. dérivé phosphorylé du phosphatidylinositol ; **PTEN**: Homologue de la phosphatase et de la tensine ; **PDK-1**: Phosphoinositide-dependent protéine kinase-1 ; **Akt**: Akt1, protéine kinase B (PKB) ; **GLUT1/4**: Transporteur de glucose de type 1 ou 4 ; **p27**: Protéine 1 inhibitrice des kinases (Kip1) cycline-dépendantes 2 et 4 (cdk2/4) ; **BAD**: Protéine pro-apoptotique qui appartient à la même famille que BCL-2 ; **BCL-2**: "*B-cell lymphoma* 2", protéine anti-apoptotique ; **IKK**: Protéine kinase de l'inhibiteur (IκB) du facteur nucléaire kappa B (NF-κB) ; **FoxO**: Facteur de transcription *"Forkhead Box O"* ; **GSK3β**: Protéine kinase 3 bêta de la glycogène synthase (GS) ; **eIF2B et eIF4B/E**: Facteurs d'initiation de la traduction eucaryotique (eIF) ; **TSC1-TSC2**: Complexe protéique hamartine-tubérine ; **AMPK**: Protéine kinase activée par l'AMP ; **RHEB**: Homologue de RAS enrichi dans le cerveau ; **mTOR**: Cible de la rapamycine chez les mammifères ; **p70S6K**: Kinase de la protéine ribosomale S6 d'une masse de 70kD ; **S6**: Protéine ribosomale ; **4EB-P1**: Facteur d'initiation 4E de la traduction eucaryotique ; **IGF-1R**: Récepteur de l'IGF-1 ; **IGFBP**: Protéine de séquestration des récepteurs de l'IGF ; **Shc**: Protéine adaptatrice contenant un domaine homologue à Src ; **GRB2**: Protéine adaptatrice 2 liant un récepteur de facteur de croissance ; **SOS**: Protéine *"Son of Sevenless"* ; **RAS**: *"Rat sarcoma viral oncogene"*, protéine activée par des mitogènes ; **RAF**: Serine/Threonine Kinase qui a un rôle mitogène ou proto-oncogène dans le cas d'une expression augmentée ; **MEK1/2 et MKK4/7**: Deux isoformes de la famille des MAPKK, kinases de MAPK ; **MAPKKK**: kinase de MAPKK ; **MAPK**: Protéine kinase activée par des mitogènes ; **ERK1/2**: Kinases régulées par un signal extracellulaire ; **Myc**: c-Myc, *"myelocytomatosis oncogene"*, proto-oncogène ; **Max**: Facteur X associé à myc ; **Mad**: Protéine qui se dimérise avec Max ; **Fos**: *"FBJ osteosarcoma"*, oncogène qui peut se dimériser avec Jun pour former le complexe AP-1; **Jun**: Proto-oncogène ; **JNKs**: Kinases de Jun ; **P**: Groupe phosphoryl $PO3^{2-}$ ; **Thr**: Thréonine.

### 1.3.2. Masse grasse et adipokines

Le tissu adipeux est capable d'exercer des effets sur certains des autres processus évoqués. Ces derniers sont notamment médiés par la sécrétion de cytokines, appelées "adipokines". L'AP permet d'une part de diminuer la conversion des androgènes en oestrogènes sous l'action de l'aromatase via la perte de masse adipeuse **(Winzer et al. 2011)**. D'autre part, dans le cas des cancers du sein traités avec des inhibiteurs de l'aromatase, l'AP pourrait également avoir un effet bénéfique sur le maintien de la densité osseuse **(Bachmann et al. 2015)**. Toutefois ces modifications n'apparaissent pas de façon cohérente dans l'ensemble des études. En effet, la significativité clinique de la diminution de leptine avec l'AP est difficile à interpréter du fait qu'une revue a montré que l'association entre leptine et cancer du sein n'a été confirmé que dans peu d'études **(Winzer et al. 2011)**. Il semblerait que les effets de l'AP dans la voie métabolique de l'insuline seraient plus prononcés chez les femmes obèses ou sédentaires, c'est-à-dire celles présentant les plus hauts niveaux d'insuline sérique **(Carayol 2013)**. L'adiposité est aussi un facteur de risque du cancer colorectal, du sein en post-ménopause, de l'endomètre, de l'adénocarcinome de l'oesophage, du pancréas et du rein. Un indice de masse corporelle (IMC) plus élevé est aussi associé à un taux de survie plus faible des cancers du sein, du côlon-rectum, de l'oesophage, du pancréas, du rein, de l'estomac, de la prostate, des cancers pelviens, du lymphome non-hodgkinien et du myélome multiple **(Winzer et al. 2011)**.

### 1.3.3. Processus inflammatoire

L'inflammation systémique est associée à la progression de nombreux cancers, notamment le cancer du sein. En ce qui concerne les effets de l'AP dans l'inflammation, Carayol rapporte notamment une étude montrant une amélioration dans l'activité des lymphocytes *natural killers* (LNK) et dans la prolifération spontanée des autres lymphocytes. Cela conduit à émettre l'hypothèse d'un effet bénéfique d'une intervention en AP sur des marqueurs de l'immunité **(Carayol 2013)**. Les LNK jouent surtout un rôle dans la défense contre les infections procaryotiques, mais sont aussi impliquées dans l'élimination des cellules tumorales. Toutefois cette augmentation des cellules immunitaires compétentes n'est que transitoire. Il s'ensuit une diminution importante de leur concentration sanguine dans les heures qui suivent l'arrêt de l'exercice. Par ailleurs, Il a été proposé que l'AP puisse réduire le risque de récidive de cancer en augmentant la fonction immunitaire, ce qui conduit à une meilleure détection et destruction des cellules anormales, comme les cellules tumorales par exemple. En effet, la cytotoxicité des LNK et la prolifération des lymphocytes augmente nettement en réponse à l'AP chez les survivantes d'un cancer du sein **(Winzer et al. 2011)**. l'AP semble également pouvoir diminuer l'inflammation grâce à la synthèse et la sécrétion de la cytokine pro-inflammatoire interleukine-6 (IL-6) par le MSS en contraction. L'IL-6 active à son tour une cascade de médiateurs anti-inflammatoires **(Winzer et al. 2011)** **(Figure 2)**. L'IL-6 synthétisée par le MSS est la toute première myokine identifiée et aussi la plus étudiée du fait que sa concentration peut être multipliée par 100 dans le sang pendant l'AP. Cette découverte a relancé l'intérêt de la communauté scientifique concernant les rôles joués par cette cytokine dans le métabolisme et a en même temps créé un paradoxe. D'une part, l'IL-6 est produite et libérée de façon très remarquable dans la période qui suit l'AP, lorsque l'action de l'insuline est accrue, mais, d'autre part, la sécrétion d'IL-6 a également

été associée au tissu adipeux dans le cas de l'obésité et de l'insulino-résistance (**Pedersen 2009**).

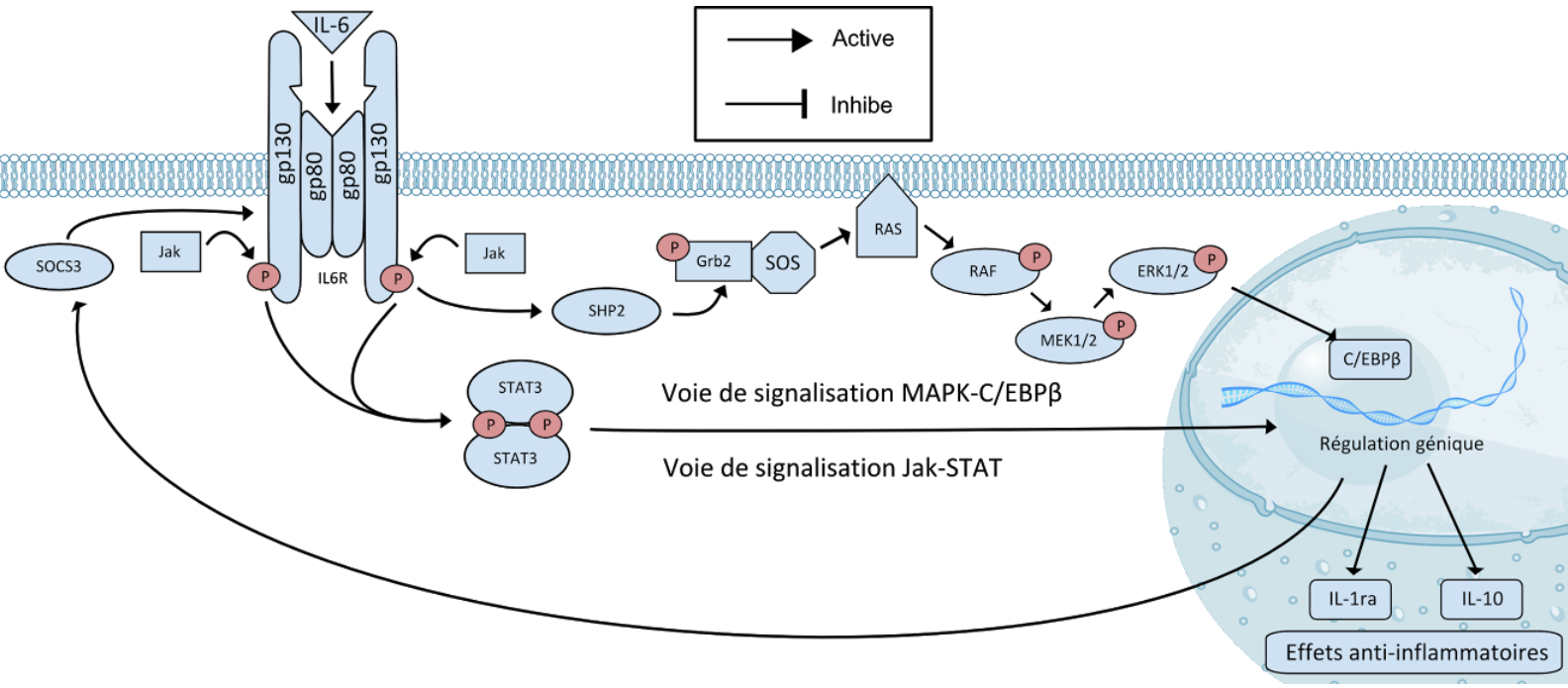



**Figure 2: Voie de signalisation de l'IL-6**

L'AP semble également réduire les concentrations de protéine C réactive (CRP), une protéine de la phase inflammatoire aiguë non spécifique et du facteur de nécrose tumorale α (TNF-α). Chez des patients en rémission d'un cancer de la prostate, une étude qui évalue l'impact d'un programme d'AP de 12 semaines qui mélange AP aérobie et renforcement musculaire a mis en évidence une diminution de la CRP cliniquement et statistiquement significative. Cependant chez des études évaluant l'impact d'une intervention en AP sur la diminution des marqueurs de l'inflammation, la CRP et l'IL-6 n'ont pas présenté de résultats concluants. (**Carayol 2013**). L'association entre l'AP et le niveau de CRP n'est pas encore bien défini dans le reste de la littérature. Ces études montrent également que l'AP n'aggrave pas les niveaux circulants de testostérone et d'antigènes (Ag) spécifiques de la prostate (**Carayol 2013**). Des niveaux élevés de CRP ont été associés à un risque de récidive et de mortalité par cancer du sein multipliés par deux, indépendamment de l'IMC et du stade tumoral. L'AP a un effet modéré sur la réduction de la concentration de CRP chez les survivantes de cancer du sein. Bien que les résultats de cette étude ne soient pas très significatifs, la réduction de 27% de la concentration de CRP observée pourrait bien être importante cliniquement (**Winzer et al. 2011**). Dans le cas du cancer du sein, l'AP permet également de diminuer les concentrations d'hormones sexuelles responsables du développement tumoral. Par contre, l'AP ne semble pas avoir d'effet défavorable sur les hormones sexuelles dans le cas du cancer de la prostate traité par déprivation androgénique adjuvante avec des agonistes de la gonadolibérine (aGnRH) (**Bachmann et al. 2015**).

### 1.3.4. Apoptose et marqueurs de l'apoptose

Des différences notables ont été observées entre les hommes et les femmes en ce qui concerne les biomarqueurs du cancer du côlon. L'AP semble effectivement avoir un effet différent sur les marqueurs de l'apoptose, Bax et Bcl-2. Ces marqueurs sont augmentés chez l'homme au niveau des sites où les polypes se forment, mais cette augmentation est moins marquée chez la femme. Une explication possible résiderait dans le fait que les oestrogènes auraient un effet protecteur contre le cancer du côlon. Cette explication serait néanmoins pondérée par le fait que, comme décrit plus haut, l'AP réduit le taux d'oestrogène. Toutefois, d'autres données épidémiologiques suggèrent au contraire que l'AP est tout aussi protectrice contre le cancer du côlon chez l'homme et chez la femme **(Winzer et al. 2011)**. Davantage d'études sont donc nécessaires sur ce sujet, d'autant plus que cet effet pro-apoptotique pourrait aussi dépendre de l'action de myokines induites par l'AP, comme la protéine SPARC **(Aoi et al. 2013)**

### 1.3.5. Stress oxydant

La pratique d'une AP est associée à une augmentation transitoire du SO dans l'organisme et notamment dans les MSS. Le SOarge excessive en différentes espèces réactives dérivées de l'oxygène moléculaire (ROS). Il exerce de très nombreux effets. Il a par exemple été relié au vieillissement et à la pathogenèse de maladies dues à l'induction de dommages cellulaires. Par exemple, l'excès de stress oxydatif se retrouve dans la plupart des maladies métaboliques impliquant un dérèglement mitochondrial. Ces phénomènes sont connus et actuellement regroupés sous le terme de "théorie du vieillissement par le biais radicaux libres" **(Ost et al. 2016)**. Le SO se retrouve aussi impliqué dans la progression de certains cancers, comme le cancer de la prostate par exemple **(Guéritat 2015)**. Ce processus est certes naturel et joue un rôle clé dans la régulation de la force et le maintien de l'homéostasie musculaire, mais son accumulation intracytoplasmique est nocive pour les cellules. Paradoxalement, une AP chronique d'intensité modérée permet de mieux préserver l'homéostasie face à l'augmentation des ROS. Cette adaptation est permise grâce à une hausse des concentrations d'enzymes antioxydantes, comme la superoxyde dismutase dépendante du manganèse (Mn-SOD), la glutathion peroxydase (GPx) et la catalase **(Guéritat 2015)**.

Ost et al. se sont concentrés sur les facteurs sécrétés par les MSS qui sont principalement induits par le stress cellulaire dans des conditions physiopathologiques et non dans le cadre d'une AP **(Ost et al. 2016)**. Les deux principaux facteurs qui se retrouvent sécrétés par les MSS lorsque les niveaux de ROS sont trop élevés sont GDF-15 et FGF-21. Les complexes I et III de la chaîne respiratoire sont des sites de production d'ions superoxydes en réponse à une activité mitochondriale augmentée durant la contraction musculaire. De plus, il existe d'autres sources d'ions superoxydes tels que la 5-lipoxygenase (5-LO), la cyclo-oxygénase (COX), les NADPH oxydases du sarcolemme (NOXs) et la xanthine oxydase (XO) **(Ost et al. 2016)**. Silveira et al. on évalué le rôle des ROS dans les augmentations d'expression des ARNm de PGC-1α, de l'hexokinase 2 (HK2) et de la protéine découplante mitochondriale 3 (UCP3) induites par les contractions musculaires en soumettant des cellules de MSS de rat à des programmes EPS aigus uniques ou répétés en présence ou en absence d'antioxydants. Ils ont observé que la contraction des cellules

musculaires conduit à une augmentation de la formation de peroxyde d'hydrogène (H2O2). Ils constatent également que la présence d'antioxydants supprime l'augmentation transitoire d'expression des ARNm de PGC-1α et UCP3 en réponse à des contraction aiguës. Il en va de même avec des sessions de contractions aiguës et répétées, mais dans ce dernier cas les antioxydants suppriment également l'augmentation transitoire de l'expression des ARNm de HK2 **(Silveira et al. 2006)**. Cela suggère que les ROS jouent un rôle permettant aux contractions d'engendrer une expression accrue de HKII, UCP3 et PGC-1α dans les cellules du MSS

En plus d'être impliqué dans le processus de la myogenèse, le SO a également des effets sur le développement et la progression des cancers. Effectivement, l'accumulation de ROS entraîne l'hydroxylation de l'ADN et abouti à des mutations telles que des changements de bases azotées ainsi qu'à des modifications de conformation de la double hélice. Ces mutations peuvent toucher et endommager des gènes suppresseurs de tumeur tandis qu'elles entraînent une augmentation de l'expression des gènes prolifératifs, les proto-oncogènes. le SO est impliqué dans les trois grandes étapes du développement du cancer, l'initiation, la promotion et la progression. Par exemple, dans l'étape d'initiation, les ROS altèrent d'une part le matériel génétique des cellules mais agissent également comme des messagers secondaires capables de modifier la régulation redox du glutathion réduit (GSH), ce qui engendre une activation de la thiorédoxine (TRX) qui active à son tour le facteur de transcription nucléaire kappa B (NF-κB) **(Guéritat 2015)**. Ce facteur est alors transloqué dans le noyau et peut activer des gènes cibles qui sont impliqués dans la progression du cancer. Par ailleurs, l'excès de peroxyde d'hydrogène ($H_2O_2$) et un déséquilibre de la balance pro/anti-oxydants activent un signal de transduction via la régulation des MAPKs. Les MAPKs entraînent des signaux depuis la membrane vers le noyau en réponse à des stimuli. Il se trouve que ces protéines régulent de nombreux processus dont la mitose, la prolifération et l'apoptose. La famille des MAPKs est une grande famille de protéines qui regroupe ERK, JNK **(Figure 1)** et p38. Ces dernières modulent l'expression de gènes en activant un grande variété de facteurs de transcription comme le complexe AP-1 entre Fos et Jun, NF-κB ainsi que la protéine p53. L'activation de ces derniers facteurs entraîne la prolifération cellulaire. Une forte concentration de $H_2O_2$ conduit également à une stabilisation et à une accumulation du facteur 1 induit par l'hypoxie (HIF-1) qui entraîne à son tour une augmentation de la synthèse du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) **(Guéritat 2015)**. Cela a pour effet de favoriser l'angiogenèse et peut faciliter le processus métastatique. Durant l'AP, l'IL-6 évoquée précédemment est produite par les muscles et stimule la formation d'autres cytokines anti-inflammatoires, telles que l'IL-1ra ainsi que l'IL-10 **(Figure 2)**. Ces dernières inhibent la production de la cytokine pro-inflammatoire TNF-α **(Guéritat 2015)**. Ce mécanisme peut permettre d'expliquer comment l'AP diminue la prolifération tumorale induite par les ROS.

L'ensemble des articles qui ont mesuré ces biomarqueurs se sont penchés sur des prises en charge avec des durées et des fréquences très variées. Ces grandes variations influencent la magnitude des effets observés sur les différents marqueurs et limitent l'interprétation **(Winzer et al. 2011)**. Ces d'études sont aussi perturbées par le temps de sédentarité, qui est une variable qui n'est pas surveillée. L'allongement du temps de sédentarité a été associé à une augmentation du risque de cancer colorectal, de la prostate,

de l'endomètre et des ovaires, mais aussi à l'insulino-résistance, à des niveaux élevés de CRP et à l'augmentation de la mortalité toute cause confondue. Qui plus est ces associations sont indépendantes du temps consacré à l'AP d'intensité intense à vigoureuse. Prescrire un nouveau programme d'AP à une population inactive permettrait de réduire le temps de sédentarité chez certaines personnes seulement. En effet, les autres personnes compenseraient le temps passé à pratiquer une AP en augmentant leur temps de sédentarité, ce qui a pour effet d'annuler les bénéfices du programme d'AP proposé **(Winzer et al. 2011)**.

Enfin, ces mécanismes liés à l'AP sont rendus d'autant plus complexes qu'ils s'influencent mutuellement via différents facteurs. Cette grande complexité est de plus en plus renforcée au fur et à mesure que des molécules sont découvertes dans le sécrétome musculaire. Ces dernières sont appelées "myokines".

## 1.4. Production de myokines durant l'AP et effets sur les cancers

Les MSS ont d'abord été caractérisés par leur activité mécanique. Cette activité mécanique est requise pour le maintien de la posture, le mouvement et la respiration qui dépendent de la contraction des fibres musculaires. Cependant, le MSS n'est pas uniquement un composant du système locomoteur, mais également un organe endocrine capable de sécréter des cytokines ainsi que d'autres petits peptides **(Pedersen 2013** ; **Schnyder et Handschin 2015)**. Les MSS possèdent ainsi un sécrétome composé de plusieurs centaines de peptides **(Henningsen et al. 2010)** qui leur permettent de communiquer et d'exercer des effets sur d'autres organes tels que le tissu adipeux, le foie, le pancréas, les os, le cerveau ainsi que sur les MSS eux-mêmes.

Le terme "cytokine" désigne toutes protéines solubles de petites tailles, entre 5 et 20 KDa, généralement composées de 160 acides aminés environ, synthétisées par une cellule ou un tissu et qui sont capables d'avoir un effet sur d'autres cellules ou tissus. Cet effet consiste en une modification d'activité ou de fonction de la cible. Il est dit "autocrine" si la cible est la cellule sécrétrice elle-même, "paracrine" ou "juxtacrine" si les cibles sont des cellules voisines et "endocrine" si les cibles sont des cellules ou tissus distants qui nécessitent un passage des cytokines dans la circulation systémique. Les cytokines sont essentielles à la communication entre les cellules et les tissus. Pedersen et collaborateurs ont proposé de regrouper sous le terme de "myokines" les cytokines et les autres petits peptides qui sont produits, exprimés et relargués par les cellules musculaires **(Pedersen et Febbraio 2012)**. Le terme "myokinome" permet ainsi de désigner le sécrétome des myotutes. Un "sécrétome" étant l'ensemble des facteurs sécrétés par une cellule sur une période donnée. Le myokinome d'un muscle n'est pas le même au repos ou à l'effort. Il n'est pas non plus le même selon l'intensité des contractions des MSS. De plus, selon le type de muscle étudié et sa localisation, la composition du sécrétome varie également **(Pedersen et al. 2007)**. En 2010, Henningsen et al. ont utilisé une méthode de protéomique quantitative pour étudier l'ensemble du sécrétome de cellules de MSS murin C2C12. En particulier durant le processus de différenciation. 635 protéines sécrétées ont été identifiées, dont 35 facteurs de croissance, 36 métallopeptidases et 40 cytokines **(Henningsen et al. 2010)**. Pour la plupart ce sont des protéines déjà connues et étudiées dans d'autres conditions.

Toutefois pour certaines le rôle qu'elles jouent pour le muscle reste encore à investiguer **(Tableau I)**. Ce mémoire n'a pas pour but de détailler la totalité des myokines actuellement connues, on préférera plutôt se pencher sur celles qui paraissent les plus prometteuses vis-à-vis de la lutte contre les cancers. Les effets des différents myokinomes sur diverses pathologies sont de plus en plus étudiés. Ces études permettent notamment de mieux comprendre et mesurer les mécanismes moléculaires impliqués lors de la prise en charge de différents cancers par de l'APA, que ce soit en prévention primaire, secondaire ou tertiaire.

Selon Ost et al., plusieurs protéines ont récemment été identifiées comme étant des myokines. Il s'agit de l'apeline (APLN), la décorine, la protéine chitinase 3-like 1 (CHI3L1) et la glycoprotéine matricielle SPARC **(Ost et al. 2016)**, parmis ces myokines, seules CHI3L1 et SPARC sont intéressante vis-à-vis des cancers.

Une étude chez l'homme a révélé que le taux de CHI3L1 plasmatique et le niveau d'expression d'ARNm de CHI3L1 dans les myotubes sont augmentés après un exercice de force aiguë et un exercice aérobie d'endurance. Les taux sanguins de CHI3L1 sont difficilement exploitables puisque CHI3L1 est exprimée dans de nombreux types cellulaires, y compris des macrophages. Les concentrations sanguines mesurées *in vivo* ne réflètent donc pas forcément sa sécrétion par les MSS. Par contre les niveaux d'ARNm ont été étudiés *in vitro* sur des myoblastes en culture électrostimulés de manière à imiter les effets de ces exercices **(Ost et al. 2016)**. Le produit du gène CHI3L1, la glycoprotéine de cartilage de 39 kDa humaine (HC-gp39, aussi connue sous le nom de YKL-40), est membre de la famille 18 des glycosides hydrolases et un marqueur de la différenciation tardive des macrophages. D'autres données récentes suggèrent également un effet local de CHI3L1 lors d'un exercice d'intensité aiguë. Elle inhiberait les voies de signalisation pro-inflammatoires et stimulerait la prolifération des myoblastes **(Ost et al. 2016)**. CHI3L1 pourrait ainsi jouer un rôle important dans la régénération musculaire, qui est un processus important pour l'adaptation du muscle à l'exercice, mais davantage d'études sont nécessaire sur ce sujet. Elle a également été suggérée comme jouant un rôle dans la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) et faciliterait ainsi le processus métastatique, i.e. la dissémination des cellules tumorales dans le sang périphérique.

En 2013, chez la souris et chez l'homme, la protéine SPARC a été identifiée comme une nouvelle myokine dont l'expression est augmentée dans le MSS et qui est sécrétée dans le sang en réponse à une AP d'intensité aiguë **(Aoi et al. 2013)**. Cette protéine tire son nom de l'acronyme de termes anglais qui en français signifient "Protéine Sécrétée, Acidique et Riche en Cystéine", elle est aussi appelée ostéonectine. Il s'agit d'une glycoprotéine matricielle, ce qui signifie qu'elle est sécrétée dans l'espace extracellulaire, mais n'a pas de fonction structurelle. Les protéines matricielles sont induites suite à une lésion tissulaire et jouent un rôle important dans le développement, le remodelage et la réparation tissulaire. Le premier rôle connu de SPARC est de relier le collagène au minéral dans la matrice osseuse, mais de nouvelles fonctions lui ont été attribuées depuis. SPARC a été associée à la fois à une inhibition de la cancérogenèse en augmentant l'apoptose dans un modèle murin de cancer du côlon et à de l'atrophie musculaire dans le muscle plantaire de rat. Dans ce dernier modèle, SPARC s'est aussi révélée être inhibée par une AP de résistance **(Ost et al.**

2016). Toutefois, la sécrétion de SPARC par les myotubes et ses effets inhibiteurs sur le développement du cancer du côlon ont aussi été associés à de l'AP chronique et modérée, mais dans un seul modèle actuellement, chez un cancer du côlon murin induit par un composé chimique carcinogénique, l'azoxyméthane (AOM) (Aoi et al. 2013). Dans ce modèle, l'inhibition du processus tumoral est apparu dès les premiers stades de formation des polypes. De plus, l'AP régulière, via SPARC, a également augmenté l'apoptose des cellules de la muqueuse du côlon ainsi que les marqueurs de l'apoptose, les formes clivées de la caspase 3 et de la caspase 8. L'augmentation du clivage de la caspase 8 plutôt que celui de la caspase 9 indique qu'il s'agit plutôt d'une apoptose intrinsèque et non d'une apoptose extrinsèque (Aoi et al. 2013). Toutefois, cet effet de SPARC n'a à l'heure actuel été observé que dans les cancers du côlon. En ce qui concerne les cancers du sein, une récente publication semble même indiquer un effet inverse, SPARC favoriserait le développement ainsi que la croissance des tumeurs et des métastases (Lindner et al. 2015). Cette action passerait par une interaction de SPARC avec des facteurs de croissance impliqués dans le remodelage de la MEC et l'angiogenèse, comme le VEGF, le facteur de croissance des fibroblastes basique (b-FGF), le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF), le facteur de croissance transformant bêta (TGF-β), ainsi que divers composants de la MEC, comme des intégrines et des métalloprotéases. D'après les auteurs, SPARC pourrait même devenir un nouveau biomarqueur prédictif dans plusieurs types de cancers où il est surexprimé, notamment le cancer du sein. Les rôles de SPARC en tant que myokine induite par l'AP restent flous et requièrent davantage d'études. Pour pouvoir étudier cette dernière, il apparaît néanmoins falloir plutôt travailler avec des programmes d'AP aiguë de haute intensité. Ainsi, pour optimiser la présence de SPARC dans un sécrétome *in vitro*, un protocole de stimulation EPS qui mime l'AP aiguë de haute intensité serait sans doute plus approprié qu'un protocole EPS mimant l'AP chronique d'intensité modérée.

Il existe aussi des preuves que plusieurs myokines peuvent médier certains des effets inhibiteurs de l'AP sur la prolifération des cellules cancéreuses du sein. Le rôle joué par ces myokines permettrait ainsi d'expliquer les observations d'études épidémiologiques récentes. Ces dernières suggèrent en effet que le risque de cancer du sein est accru chez des femmes ayant un mode de vie sédentaire alors que celles qui pratiquent une AP régulière semblent davantage protégées contre le développement du cancer du sein (Pedersen et Febbraio 2012). L'un des candidats possible parmi ces myokines est l'oncostatine M (OSM). OSM est une protéine qui appartient à la superfamille de l'IL-6, une famille grandissante de cytokines qui comprend également, en sus de l'IL-6, l'interleukine-11 (IL-11), le facteur inhibiteur de leucémie (LIF), le facteur neurotrophique ciliaire (CNTF) et la cardiotrophine 1 (CT-1). Plusieurs membres de cette superfamille contribueraient à la myogenèse *in vitro*, à la régénération musculaire ainsi qu'à la prolifération *in vivo*. Ces dernières agissent à des stades distincts dans ces processus, via des voies de signalisation et des effecteurs différents (Muñoz-Cánoves et al. 2013). Cependant, OSM semble également avoir des effets sur les MSS qui pourraient bien limiter son intérêt et son utilisation potentielle contre le cancer du sein. Effectivement, des preuves que l'OSM et la CT-1 jouent un rôle négatif dans la myogenèse *in vitro* et *in vivo* ont récemment été apportées (Muñoz-Cánoves et al. 2013). OSM et CT-1 semblent inhiber la différenciation des myoblastes en myotubes. Pour OSM, cet effet passerait par l'activation de la voie de signalisation JAK1/STAT1/STAT3. *In vitro*, STAT1 peut intéragir avec le gène du facteur-2

musculaire activateur de la transcription (MEF2) et réprimer son activité transcriptionnelle. Enfin, une expression prolongée d'OSM dans des MSS endommagés abouti à une mauvaise régénération musculaire **(Muñoz-Cánoves et al. 2013)**. En ce qui concerne CT-1, son action semble médiée de manière préférentielle par l'activation de la voie de signalisation MEK/ERK, qui pourrait à son tour interférer avec l'activation de facteurs de régulation myogéniques importants **(Muñoz-Cánoves et al. 2013)**. Ces effets restent encore à étudier. En somme, ces données récentes suggèrent que la CT-1 et l'OSM pourraient être impliquées dans le maintien de l'état indifférencié des cellules progénitrices musculaires. CT-1 et OSM empêcheraient ainsi la différenciation des cellules satellites et agiraient conjointement avec IL-6 et LIF qui favorisent de leur côté la prolifération.

SPARC et OSM inhibent ainsi respectivement la formation de tumeur dans le côlon et la croissance des cellules cancéreuses mammaires. Ces myokines inhibent la prolifération tumorale et induisent l'apoptose des cellules cancéreuses. Bien que ces effets soient d'une importance thérapeutique évidente, les rôles physiologiques des ces deux protéines demeurent flous **(Schnyder et Handschin 2015)**. A l'avenir, des études devraient chercher à éclaircir comment SPARC et OSM régulent la prolifération cellulaire et l'apoptose après avoir été produites et sécrétées par le MSS en contraction. Il conviendrait aussi de savoir si ces dernières ont des effet complètement différents sur des cellules saines.

A terme, le protocole de stimulation EPS qui va être mis en place devrait permettre de faire synthétiser et sécréter ces différentes myokines par des myotubes en culture. Toutefois il apparaît que la formation de certaines, comme SPARC, serait favorisée par un programme EPS aigu de haute intensité, à l'inverse d'autres myokines, comme OSM, qui semblent davantage favorisées par un programme EPS chronique d'intensité modérée. Cette diversité de réponses des différentes myokines aux stimulations rend complexe le choix des paramètres EPS. Ces derniers dépendent donc à la fois du type d'AP que l'on souhaite mimer mais également des facteurs que l'on souhaite réussir à exprimer afin d'étudier par la suite leurs effets sur différents cancers.

## 2. Modèles animaux pour l'étude des effets de l'AP *in vivo*

Afin de pouvoir étudier davantage les processus cellulaires et moléculaires impliqués dans la réponse du corps humain à l'AP et la plasticité des MSS, les seules méthodes à disposition sont des techniques invasives, comme les biopsies musculaires. C'est la raison pour laquelle des modèles animaux capables de mimer l'AP de l'Homme ont été développés. Les plus utilisés sont les rongeurs, et tout particulièrement le rat. Plusieurs techniques permettent de faire pratiquer un exercice et également d'évaluer l'AP chez ces modèles. Deux types d'outils permettent d'estimer l'AP de l'animal en cage, les actimètres et les télémètres. Les télémètres sont nettement plus invasifs que les actimètres puisqu'ils nécessitent l'implantation d'un capteur sur le spécimen étudié. Les actimètres peuvent être de différents types, ils peuvent utiliser une grille composée de faisceaux et de capteurs infrarouges, reposer sur un monitorage par analyse d'image vidéo ou bien encore mesurer indirectement la force musculaire déployée, par exemple en détectant les vibrations transmises par la cage. Cette dernière méthode convient bien pour détecter les mouvements et les comportements légers et subtils tels que les tremblements, mais elle n'est cependant

pas adaptée à la détection d'une AP spontanée importante. Les méthodes qui conviennent le mieux dans ce dernier cas de figure sont la mesure d'activité sur roue instrumentée ou sur tapis roulant motorisé. De plus, d'autres options ont également été explorées, comme la nage forcée en bassin et l'électrostimulation de basse fréquence du MSS (10 Hz). Toutefois, la nage forcée est un exercice qui n'est pas modulable en intensité et l'électrostimulation n'engendre que de la contraction concentrique chez les fibres musculaires lentes et oxydatives de type 1, contrairement à la course sur tapis roulant qui entraîne différents types de contractions, isométrique, excentrique et concentrique. Ainsi ces deux dernières approches apparaissent moins appropriées **(Ferry et Rieu 1994)**.

Le modèle du tapis roulant motorisé utilisé pour mimer la course d'endurance chez le rongeur est le principal modèle animal d'AP. Son effet chronique reproduit les mêmes adaptations que celles observées chez l'être humain entraîné à la course d'endurance **(Ferry et Rieu 1994)**. Afin que les effets observés soient reproductibles, la vitesse, la durée de course, la fréquence des entraînements, la durée totale du programme et la pente du tapis sont réglés rigoureusement selon l'âge et les capacités physiques des rongeurs ainsi que des objectifs expérimentaux fixés. Ces derniers peuvent viser à mimer l'effort d'endurance modéré, en maintenant le rat en dessous de sa vitesse maximale aérobie (VMA), intense, voire même de mener le rongeur jusqu'à l'épuisement physique. Enfin, cette technique d'entraînement a le défaut d'être perturbante, ce qui rend nécessaire de laisser une semaine d'acclimatation, composée de courtes sessions de course sur tapis, avant le début du programme.

L'utilisation du modèle animal implique toujours certaines limites. Il convient par exemple de garder à l'esprit que ces animaux sont en cage, donc sédentaires. La question de la pertinence de leur utilisation dans des modèles d'étude des effets de l'AP peut se poser. Qui plus est, les animaux doivent être seuls en cage pour permettre les mesures. Cette solitude les expose à un stress chronique qui peut même mener à de la dépression ou à une anxiété accrue. Il convient de se demander si cette condition ne stress n'influence pas ou altère les effets de l'AP. Dans ces modèles animaux, les effets observés sur les tumeurs étudiés ne peuvent pas être imputés au sécrétome des MSS avec certitude, du fait de la présence de facteurs sécrétés par les autres organes, d'hormones et d'autres facteurs humoraux. C'est pourquoi les modèles *in vitro* présentent un intérêt important, pour se couper du reste de l'organisme.

## 3. Mimer l'AP *in vitro*

Il existe plusieurs approches permettant de mimer l'AP et d'étudier ses effets *in vitro*. Il est possible de traiter les myocytes avec différents composés chimiques pour induire les mêmes modifications métaboliques et biochimiques que l'AP. Un exemple de stimulation chimique bien connu est celui du 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucléotide (AICAR). les effets de l'AP chronique peuvent effectivement être mimés par un traitement chronique en AICAR, un analogue de l'adénosine monophosphate (AMP). Un traitement en AICAR augmente l'activité musculaire, la CS, la succinate deshydrogénase (SDH) et le cytochrome c somatique (CYCS). Cet agent se substitue à l'AMP pour activer la protéine kinase normalement activée par l'AMP (AMPK) **(Coisne 2007)**. Cette activation de l'AMPK entraîne

une augmentation intracellulaire de ZMP, un analogue non métabolisable de l'AMP. Il a été récemment démontré que l'AMPK activée favorise la biogenèse mitochondriale musculaire par activation du facteur de transcription PGC-1α, ce qui permet d'optimiser l'oxydation des substrats (**Foretz et al. 2006**). La stimulation peut également être mécanique (**Qin et Hu 2014**), on parle alors d'effets liés à la mécanotransduction. Enfin, la troisième approche, qui est celle étudiée dans ce mémoire, consiste à imiter la stimulation électrique des myocytes qui a lieu lors de l'AP et qui permet d'induire leur contraction. Cette méthode d'électrostimulation *in vitro* se nomme méthode EPS, pour "Electrical Pulse Stimulation". Actuellement, les modèles expérimentaux mimant l'AP sont toujours inadéquats, ce qui empêche de combler les lacunes sur les relations entre les différentes voies de signalisation moléculaires durant l'AP (**Lambernd et al. 2012**).

## 3.1. Description du système EPS

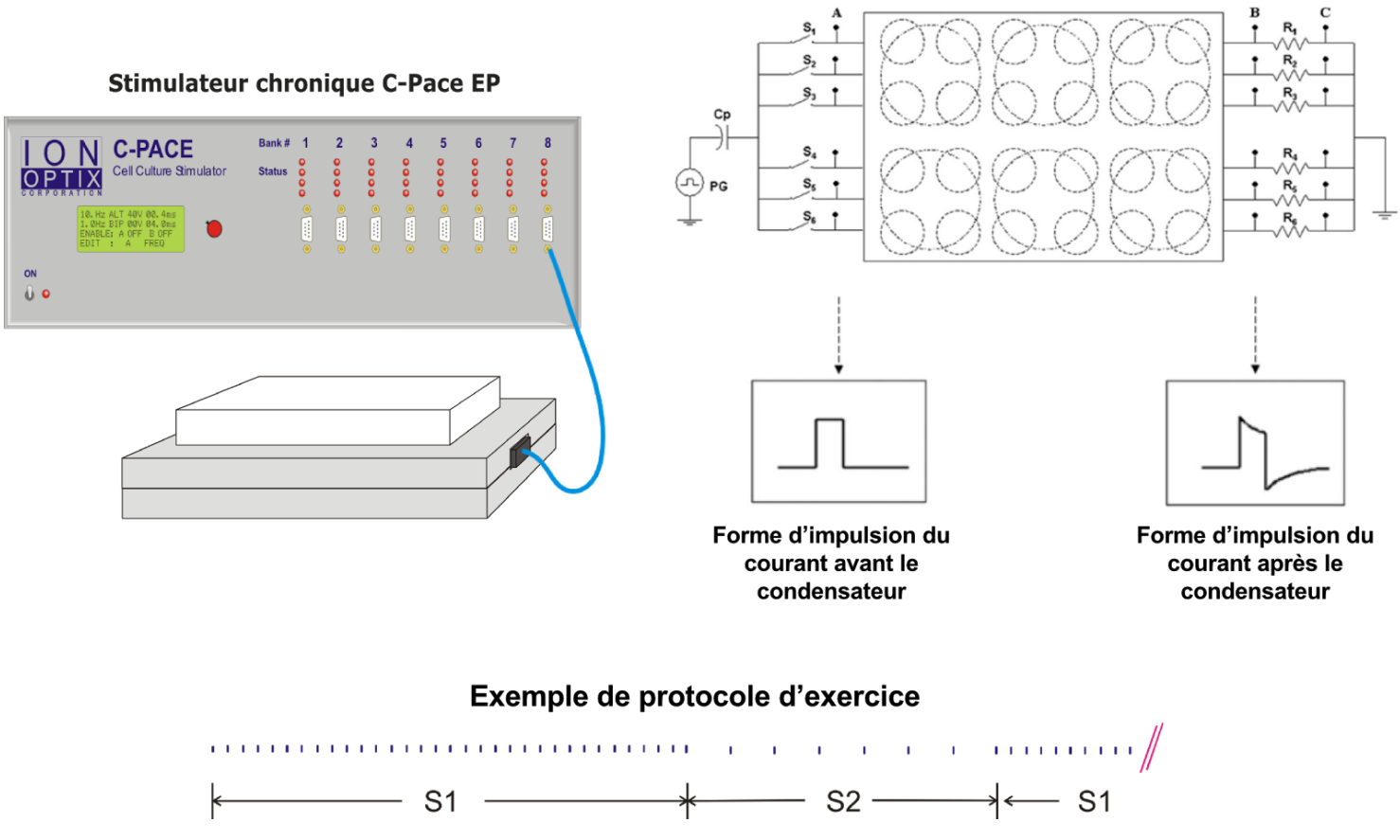



**Figure 3: Stimulateur électrique de cellules en culture, adapté de Marotta, Bragós, et Gómez-Foix 2004**

La méthode EPS permet d'envoyer des impulsions électriques sur des cellules en culture. Elle peut notamment être utilisée sur des myotubes afin de stimuler leur contraction et ainsi imiter l'activation des fibres musculaires par les motoneurones (**Orfanos et al. 2016**). Le C-Pace EP, le stimulateur de cellules en culture de IonOptix, est un système de stimulation électrique automatisé qui permet de programmer une boucle alternant temps de stimulation et temps de récupération (**Figure 3**). Cette boucle peut-être composée d'un maximum de 8 séquences. Un plateau de 6 boites de culture individuelles de 35 mm de

diamètre (C-Dish, IonOptix) est utilisé (voir figure ci-dessous). Avant chaque utilisation, le fond des boîtes est d'abord recouvert de laminine ou de collagène **(Burch et al. 2010 ; Gaster, Beck-Nielsen, et Schrøder 2001)**, ce qui permet aux cellules d'adhérer en mimant l'environnement des cellules *in vivo*, la MEC. Le courant est amené par deux électrodes plongées dans le milieu. Celles-ci sont en général en carbone, on parle alors d'électrodes en graphite **(Burch et al. 2010 ; Lambernd et al. 2012 ; Gogh et al. 2015)**. Toutefois certaines équipes préfèrent plutôt utiliser des électrodes en platine **(Silveira et al. 2006 ; Xiong et al. 2015)**. Le choix d'un type d'électrode plutôt qu'un autre n'est pour le moment justifié par aucune étude. Le type d'onde utilisé a aussi son importance. A l'inverse de la stimulation en continu par courant galvanique, la stimulation par ondes biphasiques rectangulaires minimise les réactions non-faradiques délétères et irréversibles qui se déroulent au niveau de l'interface myocytes-électrodes ou tissu-électrodes. De plus, les stimulis biphasiques rectangulaires symétriques ne laissent théoriquement aucune charge résiduelle, ce qui les rend d'autant plus intéressants pour l'étude du comportement des myocytes.**(Xiong et al. 2015)**.

## 3.2. Lignées cellulaires et méthodes de culture utilisées

Pour que ces protocoles EPS fonctionnent, il faut que les myotubes utilisés aient auparavant été cultivés dans les meilleures conditions possibles et que leur état de différenciation permette une réponse contractile. Les modèles d'étude les plus fréquents sont les myocytes de souris C2C12 et SOL8 **(Burch et al. 2010 ; Gogh et al. 2015 ; van der Schaft et al. 2013)** ainsi que les myocytes de rats Wistar **(Silveira et al. 2006)**. Les myocytes murins C2C12 et SOL8 sont issus respectivement de muscles glycolytiques et de muscles oxydatifs **(Burch et al. 2010)**. Pour le moment, peu d'études utilisent des myocytes humains **(Nikolić et al. 2012 ; Lambernd et al. 2012)**. La nature des milieux de culture et de différenciation utilisés influence les processus de prolifération et de différenciation des myocytes en myoblastes puis en myotubes, c'est pourquoi il est important de les discuter.

Dans les protocoles étudiés, les cellules sont ensemencées dans un milieu de culture classique DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Minimal Essential Medium) à 4,5 g/l de glucose (Lonza, Basel, Switzerland) **(Gogh et al. 2015)** et placées dans une atmosphère humidifiée, à 37°C et 5% $CO_2$ **(Nikolić et al. 2012)**. Un premier milieu est utilisé pour la croissance des myocytes et un second pour la différenciation. La complémentation de ces 2 milieux est différente.

Chez C2C12, le milieu de croissance est du DMEM à 4,5 g/l de glucose complémenté avec du sérum foetal bovin inactivé par la chaleur (FBS ; 10% ; 100µg/ml ; Gibco/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) et de la pénicilline et de la streptomycine (P/S), toutes les deux à la même concentration (10% ; 100µg/ml) **(Gogh et al. 2015)** afin de réduire le risque de contamination microbienne. Dans le protocole mis en place par Gogh et al., les cellules sont cultivées dans ce milieu jusqu'à atteindre 80-90% de confluence. Cette étape dure en général entre 2 et 3 jours. Chez les myocytes de rat Wistar **(Silveira et al. 2006)**, du sérum de veau foetal (FCS, 20%, 200µg/ml) est ajouté. Dans le protocole de Silveira et al., cette étape dure 2 jours. Chez les myocytes humains **(Nikolić et al. 2012)**, les cellules sont cultivées à 80% de confluence, dans un milieu DMEM-GlutaMAX, avec du FCS

(2%), de l'Ultroser G (2%), de la pénicilline (50 U/ml), de la streptomycine (50 mg/ml), de l'amphotéricine B (1,25 mg/ml), sans insuline ajoutée. Dans le protocole de Nikolić et al., cette étape dure de 7 à 14 jours **(Tableau II)**.

Le milieu de croissance est ensuite remplacé par un milieu de différenciation. Chez C2C12 **(Gogh et al. 2015)**, ce milieu est du DMEM à 4,5 g/l de glucose complémenté avec de la P/S (10% ; 100µg/ml) et du sérum de cheval (HS ; 2% ; 20µg/ml ; Gibco/Life Technologies). La différenciation doit durer entre 4 et 6 jours et le milieu de différenciation doit être changé toutes les 24 h **(Tableau III)**. Cette étape de différenciation permet qu'une majorité de myoblastes C2C12 fusionnent entre eux pour former des myotubes avec un syncytium plurinucléé **(Gogh et al. 2015)**. Burch et al. débutent leurs protocoles EPS environ 1 h après que le milieu de différenciation ait été retiré pour être remplacé par un milieu DMEM contenant de l'albumine de sérum bovin (BSA ; 0,1% ; 1 µg/ml) et supplémenté avec de la pénicilline (1% ; 10 µg/ml ), et de la streptomycine (1% ; 10 µg/ml) **(Burch et al. 2010)**. Toutefois, comme le soulignent Gogh et al., le fait de commencer trop tôt l'électrostimulation ne permet pas d'exclure complètement les effets des différents facteurs, pour la plupart des facteurs de croissance et des immunoglobulines (Ig), qui sont présents dans le sérum utilisé pour la différenciation **(Gogh et al. 2015 ; Lambernd et al. 2012)**. Ainsi, il serait préférable de laisser les myotubes reposer dans un milieu DMEM sans aucun sérum, aucune complémentation en FBS ni HS, durant une nuit, puis, de renouveler le milieu sans sérum juste avant le début du protocole EPS le lendemain. Cette étape d'arrêt de la différenciation permet de minimiser les effets d'éventuels facteurs sécrétés par les myotubes durant la nuit.

Les points sur lesquels les protocoles des différentes publications étudiées sont le moins en accord sont les supplémentations en sérums des milieux de croissance et de différenciation. Il est plus intéressant d'utiliser du FBS que du FCS dans le milieu de croissance puisqu'il contient plus de facteurs de croissance et moins d'immunoglobulines (Ig), ce qui le rend plus efficace et moins toxique pour les cellules. Toutefois le FCS est souvent moins onéreux que le FBS. Pour s'assurer que les myocytes ne partent pas en différenciation durant la phase de croissance, il est aussi possible d'ajouter du FGF2 (Fibroblast growth factor 2) en plus du FBS. Les C2C12 passent par 2 phases successives, une phase de prolifération et une phase de différenciation. Durant la phase de croissance avec le FBS, les myocytes sont dans un état hautement prolifératif. Cet état est lié au fait que le FBS contient une quantité importante de facteurs de croissance. Pour passer de la phase de prolifération à la phase de différenciation, il faut freiner la croissance des myocytes. Pour cela, le milieu DMEM supplémenté en FBS à 10% est retiré et remplacé par un milieu DMEM supplémenté en HS à 2%. Ce second sérum est moins concentré en facteurs de croissance que le FBS. Par contre, le HS est plus concentré en insuline que le FBS, ce qui permet également de faciliter le processus de différenciation. Dans certains protocoles, de l'insuline est même ajoutée en plus du HS à 2% **(Nikolić et al. 2012)**. Une autre possibilité serait non pas de remplacer le FBS par du HS, mais de passer d'une concentration de 100µg/ml à une concentration de 1-2µg/ml de FBS.

En ce qui concerne le milieu de stimulation, certaines des études antérieures sur l'EPS utilisé sur des myotubes indiquent qu'un milieu de stimulation sans sérum pourrait être

plus approprié qu'un milieu de stimulation avec du sérum pour réussir à induire les mêmes adaptations que celles produites par l'AP **(Burch et al. 2010)**. Il est possible que des niveaux élevés de ROS dans le milieu de stimulation sans sérum contribuent à l'induction de l'expression des gènes impliqués dans le processus adaptatif. Fait intéressant, un effet similaire sur la performance à l'exercice avec une complémentation en vitamines et en fortes doses d'antioxydants a également été montré chez l'homme **(Burch et al. 2010)**. Dans les expériences réalisées par Burch et al., aucune différence significative entre les conditions avec sérum et les conditions sans sérum n'ont été observées. Cela pourrait être expliqué par des différences de conditions dans la culture cellulaire et la méthode EPS. Néanmoins, les résultats qu'ils ont obtenu indiquent que des myotubes C2C12 stimulés par EPS pourraient aussi être utilisés pour étudier *in vitro* les effets des ROS et des antioxydants sur les MSS durant et après l'AP **(Burch et al. 2010)**. En outre, il parait également intéressant d'utiliser un sérum composite de nature connue dans le milieu de stimulation. Ce dernier pourrait être supplémenté avec des facteurs additionnels afin d'étudier leurs effets sur l'adaptation musculaire à l'AP.

Les cellules adhérentes à la surface du flacon sont le plus souvent détachées avec l'enzyme trypsine, qui permet de cliver certaines protéines d'adhésion. Cependant, bien que l'utilisation de la trypsine soit nettement moins traumatisante pour les cellules que l'utilisation d'un grattoir, il existe une 3ème méthode encore moins stressante. En effet, il est aussi envisageable d'utiliser un chélateur du calcium, comme l'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA) mélangé à un tampon phosphate salin (TBS), qui permet d'inhiber l'adhésion des lectines au substrat. Le défaut de cette dernière méthode est qu'elle ne permet pas d'empêcher l'adhésion des cellules entre elles.

Après l'étape de différenciation des myotubes et avant le début du protocole EPS, deux paramètres importants sont à vérifier avant le début du protocole EPS, l'état de différenciation des myocytes en myotubes ainsi que leur réponse contractile à des impulsions électriques.

## 3.3. Différenciation des myotubes

Il existe un certain nombre de méthodes permettant de vérifier que la différenciation des cellules satellites en myoblastes, puis en myotubes est complète. L'électrostimulation couplée à un examen au microscope peut-être appliquée à la fin du processus de différenciation pour vérifier l'état fonctionnel et la contractilité des myotubes **(Silveira et al. 2006)**. Cela permet de savoir si les sarcomères sont complètement développés. Il convient de bien attendre la fin de la différenciation car l'électrostimulation durant la différenciation a pour effet de changer l'expression des isoformes de chaînes lourdes de myosine (MyHC). La différenciation et la maturation des myocytes peut aussi être analysée par RT-qPCR en allant évaluer l'expression des ARNm des différents gènes impliqués dans ces processus. Un marquage des protéines impliquées dans la maturation musculaire peut également être réalisé. Cette différenciation et cette maturation des myocytes sont associées à l'augmentation de l'expression des gènes du facteur de différenciation myogénique (MyoD), appartenant à la famille des facteurs de régulation myogéniques (MRF), de la myogénine (Myf-4), de l'herculine (Myf-6), de la protéine des muscles des membres inférieurs (MLP),

ainsi que des gènes des isoformes de chaîne lourde de myosine (MYH) 1,2,4 et 8, ce qui entraîne l'augmentation de la quantité des isoformes de MyHC. Le gène MYH 2 code notamment pour l'isoforme MyHC-IIa. Ce profil d'expression génétique indique une complète différenciation, ou encore que le tissu musculaire est bien formé **(Langelaan et al. 2011)** **(Tableau 1)**. Enfin, dans le protocole de van der Schaft et al., le développement des striations "croisées" peut-être étudié par marquage de l'α-actinine, soit sur des sections du tissu synthétisé, soit sur le tissu entier **(van der Schaft et al. 2013)**.

| Etat des cellules en culture | Cellules satellites (Progéniteur) | | Myoblastes (Précurseur) | | Fibres musculaires (Myotubes) |
|---|---|---|---|---|---|
| Processus en cours | Quiescence | Activation | Prolifération | Différenciation | Maturation |
| Gènes exprimés: | | | | | |
| **syndécanes 3/4** | | | | | |
| **m-cad** | | | | | |
| **CD34** | | | | | |
| **Pax-3** | | | | | |
| **Pax-7** | | | | | |
| **Myf-5** | | | | | |
| **MyoD** | | | | | |
| **Desmine** | | | | | |
| **MRF-4** | | | | | |
| **Myogénine** | | | | | |

**Tableau 1: Profils d'expression géniques correspondant aux différentes étapes de la myogenèse**

## 3.4. Les différents modèles et paramètres EPS

Le protocole EPS classique, qui est actuellement largement le plus utilisé, consiste à électrostimuler des myotubes qui adhèrent simplement à la surface des boites de culture. Une des limites majeure de ce modèle est qu'il ne reproduit en aucun cas l'architecture en 3 dimensions du muscle, les myotubes sont seulement disposés sur un plan, et pas forcément auto-alignés. Toutefois, un autre protocole existe aujourd'hui, qui permet de réussir à mimer *in vitro* l'architecture tridimensionnelle des fibres musculaires. Ce dernier s'inspire des avancées récentes dans le domaine de l'ingénierie tissulaire et utilise la technologie du Matrigel® (Corning) **(van der Schaft et al. 2013)**. L'EPS est en effet aussi utilisée dans ce domaine, conjointement avec des systèmes biomimétiques qui permettent de mimer la MEC, comme les surfaces bioactives et les structures tridimensionnelles **(Xiong et al. 2015)**.

L'ensemble des paramètres EPS de différents protocoles ont été rassemblés et comparés **(Tableaux IV, V, VI, VII et VIII)**. Il en est ressorti qu'il est possible de simuler des durées et des intensités d'exercice physique différentes avec différents programmes EPS. Burch et collaborateurs proposent d'imiter 3 types d'exercice: Aigu, intermittent ou continu **(Burch et al. 2010)**. Pour chaque type, tous les paramètres de stimulation sont les mêmes (Voltage: 14V; Fréquence: 50Hz; Durée d'impulsion: 1ms). Seule la durée des sessions EPS change **(Tableau 2)**.

| | Aigu | Intermittent ou chronique | Continu |
|---|---|---|---|
| **Durée EPS** | Une fois 90 min | plusieurs fois 90 min à intervalle régulier durant 4 jours | 24 h |

**Tableau 2: Les types d'exercices imités par Burch et al. avec le système EPS**

La stimulation EPS de basse fréquence en continu durant 24 h se retrouve aussi dans les travaux de Gogh et collaborateurs **(Gogh et al. 2015)** avec des paramètres de stimulation différents (Voltage: 11,5V; Fréquence: 1Hz; Durée d'impulsion: 2ms). Toutefois il apparaît également possible d'aller au moins jusqu'à 48 h de stimulation sans que des effets délétères n'apparaissent pour les myotubes **(Nikolić et al. 2012)**.

Chez des myotubes de rat, la stimulation EPS aigu durant 90 min en continu se retrouve également dans les travaux de Silveira et al. **(Silveira et al. 2006)** avec d'autres paramètres de stimulation (Voltage: 10V; Fréquence: 50Hz; Durée d'impulsion: 1ms). Pour mimer l'AP aiguë, il est aussi possible de monter à une fréquence d'électrostimulation de 100 Hz, Nikolić et al. l'ont par exemple fait pour mimer l'AP aiguë sur des myocytes humains **(Nikolić et al. 2012)**. Cependant, *in vivo*, cette fréquence, bien que considérée comme optimale pour l'entraînement de force, a comme défaut de générer rapidement une fatigue musculaire **(Dreibati et al. 2011)**. A moins d'introduire des temps de pause dans les stimulations, Il apparaît préférable d'utiliser une fréquence de 50 Hz plutôt que 100 Hz pour mimer l'AP aiguë.

Silveira et al. récupèrent les myotubes au minimum 3 h après leur programme EPS aigu de 90 min **(Silveira et al. 2006)**, ce délai semble nécessaire après un programme court afin de s'assurer d'avoir une réponse transcriptionnelle suffisante. Il ne semble par contre pas s'imposer après un programme EPS intermittent ou chronique, comme ceux de Burch et al. **(Burch et al. 2010)**. Pourtant, Burch et al. font quand même le choix d'attendre 3 h après ces programmes, en s'inspirant directement des travaux de Silveira et al., mais sans justifier ce choix.

Nikolić et al. ont mis en place et réalisé deux programmes différents de stimulation EPS. Afin de simuler une AP aiguë unique, ils ont réalisé un programme aigu et de haute fréquence, qui utilise des trains d'impulsions bipolaires d'une durée 200 ms à 100Hz et 30V, répété toutes les 5 secondes pendant 5 à 60 minutes. Le même voltage a été conservé pour simuler une AP modérée chronique régulière. Dans ce second programme, chronique et de

basse fréquence, des impulsions bipolaires uniques d'une durée de 2 ms à 1Hz ont été appliquées en continu pendant 24 ou 48 h. La particularité de ce dernier, que l'on ne retrouve pas dans les autres protocoles, est que les myotubes sont électrostimulés durant la phase de différenciation et donc en présence du milieu de différenciation. Ce choix s'explique par le fait que Nikolić et al. ne s'intéressent pas au sécrétome mais à différents biomarqueurs protéiques et enzymatiques intrinsèques comme le contenu en ATP, de phosphocréatine (PCr), de l'isoforme 4 de la pyruvate deshydrogénase kinase (PDK4), du CYCS et de la carnitine palmitoyltransferase 1B musculaire (CPT1B). Ainsi, ils ne récupèrent pas le milieu conditionné (MC) mais seulement les myotubes et les facteurs intrinsèques qu'ils contiennent **(Tableau VII) (Nikolić et al. 2012)**.

| | **Type de programme EPS** | |
|---|---|---|
| | **Chronique et basse fréquence** | **Aigu et haute fréquence** |
| **Durée totale de la session de stimulations** | 24 ou 48h | Entre 5 et 60 min |
| **Durée d'impulsion** | 2 ms | |
| **Voltage** | 30 V | |
| **Fréquence** | 1 Hz | 100 Hz |
| **Effets sur le métabolisme** | Augmentation du métabolisme oxydatif | Augmentation du métabolisme glycolytique |
| **Changements cellulaires observés** | Biogenèse mitochondriale | remodelage métabolique |
| **Variations de différents marqueurs** | oxydation du glucose et des acides gras ↗ | Lactate ↗ Absorption de 2-DG ↗ [ATP] ↘ [PCr] ↘ |
| | PDK4 ↗ IL-6 ↗ CYCS ↗ CPT1b ↗ | |

**Tableau 3: Les programmes EPS proposés par Nikolić et al. et leurs effets sur les myotubes**

Les travaux de Burch et al. se sont notamment concentrés sur l'expression et les fonctions de PGC-1α chez des myotubes murins C2C12 stimulés par EPS. Cette protéine est au coeur des adaptations du muscle à l'AP. Elle régule au niveau transcriptionnel les différents programmes biologiques impliqués dans cette adaptation. Les effets de cette protéine ont été étudiés à partir d'un modèle construit à l'aide de vecteurs viraux permettant une expression de PGC-1α ectopique, c'est à dire dans une région extérieure au noyau. Il a ainsi été possible de savoir comment PGC-1α induit et co-active certains de ses partenaires de liaison et ainsi augmente la production de différents facteurs de transcription **(Burch et al. 2010)**. *In vitro*, Burch et al. on démontré que l'élévation d'expression de PGC-1α déclenchée par l'EPS est aussi suffisante pour augmenter les niveaux de ces facteurs de transcription. Elle permet également d'augmenter la transcription de gènes mitochondriaux impliqués dans la phosphorylation oxydative.

Chez des myotubes murins C2C12 stimulés par EPS, Burch et al. ont également recherché et quantifié d'autres protéines qui, comme PGC-1α, permettent une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans l'adaptation du muscle à l'AP. Ils ont ainsi trouvé des niveaux élevés de CYCS et d'acyl-CoA déshydrogénase des acides gras à chaîne moyenne (MCAD). La stimulation EPS de myotubes peut être optimisée afin de reproduire au plus près les changements observés dans l'expression des gènes chez un MSS entraîné *in vivo*. Des conditions expérimentales précises peuvent être établies en utilisant PGC-1α comme un marqueur de l'adaptation des fibres musculaires à l'AP chronique d'endurance **(Burch et al. 2010)**. Chez des myotubes humains en culture, après 24 ou 48 h de stimulation EPS chronique, basse fréquence, Nikolić et al. ont également observé des changements dans les niveaux d'expression de plusieurs gènes. Le niveau d'expression de l'ARNm de la PDK4 est augmenté significativement. Cela implique une augmentation du lactate à partir de l'action de la lactate déshydrogénase (LDH) sur le pyruvate qui n'est plus transformé en acétyl-coA à cause de l'inhibition de la pyruvate déshydrogénase par la PDK4. De plus, Nikolić et al. ont montré que chez des myotubes humains avec un programme EPS chronique de basse fréquence, l'expression des ARNm de l'IL-6, du CYCS et de CPT1B ont également tendance à augmenter **(Nikolić et al. 2012)**. En revanche, l'expression des gènes des transporteurs de glucose GLUT1 et GLUT4 ne semble pas être affectée. Il apparaît ainsi que l'EPS chronique de basse fréquence augmente le métabolisme oxydatif des myotubes en culture sans augmenter le métabolisme glycolytique. Cette variation métabolique se retrouve également *in vivo* quand les MSS s'adaptent à une AP d'endurance chronique. Il est ainsi possible d'en conclure que, d'après l'expression de ces différents marqueurs, les paramètres EPS utilisés par Burch et al. chez des myotubes murins C2C12 et par Nikolić et al. chez des myotubes humains permettent de mimer l'AP chronique d'endurance. Lambernd et al. de leur côté ont utilisé l'AMPK et l'IL-6 comme marqueurs de ce même type d'AP afin d'estimer la meilleure fréquence de stimulation entre 0,1, 1 et 10 Hz permettant de mimer l'exercice chronique d'endurance pour un même voltage (11,5 V) et durée d'impulsion (2 ms) **(Lambernd et al. 2012)**. Ces deux facteurs sont d'ailleurs liés, puisque l'expression d'AMPK est rapidement augmentée en présence d'IL-6 **(Raschke et Eckel 2013)**. D'après l'expression de ces marqueurs, la fréquence la plus favorable semble être plus proche de 1 Hz que des autres valeurs testées **(Tableau VIII)**.

Par ailleurs, il est observé une augmentation du niveau d'expression relatif des gènes codant pour les protéines impliquées dans l'importation des acides gras et la β-oxydation, ainsi que ceux impliqués dans l'absorption du glucose et dans la conversion du pyruvate en acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA). Cela suggère que la fonction mitochondriale et la disponibilité du substrat sont augmentées chez les myotubes C2C12 en culture stimulés par EPS. Cet effet est également observé dans le MSS entraîné. Une expression augmentée de la glycogène synthase (GYS) dans des cellules après un programme EPS reflète aussi les effets de l'AP *in vivo*. Une synthèse de glycogène augmentée contribue à reconstituer et augmenter son stockage dans le muscle entraîné **(Burch et al. 2010)**. Par conséquent, le profil d'expression des gènes chez les myotubes C2C12 stimulés par EPS suggère un vaste remodelage métabolique, comme ce qui est observé *in vivo* chez le muscle entraîné. Effectivement, *in vivo*, la contribution relative de l'oxydation des acides gras à la demande énergétique globale est augmentée chez les sujets sains qui exécutent une AP d'intensité modérée. De plus, il semble que l'AP réduit la dépendance vis-à-vis des

hydrates de carbone comme source d'énergie et augmente en contrepartie la β-oxydation des acides gras **(Nikolić et al. 2012)**. Tandis que l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme détermine l'utilisation des substrats, d'autres paramètres de la fibre musculaire, comme la vitesse de contraction et la génération du pic de force, sont contrôlés par des protéines myofibrillaires telles que les isoformes de la MyHC.

Les travaux de Nikolić et al. ont montré qu'en stimulant intensément et ponctuellement des myotubes en culture avec un programme EPS aigu de haute fréquence, l'absorption de déoxyglucose (2-DG) ainsi que la production de lactate sont augmentées, tandis que les contenus entre ATP et PCr sont diminués **(Nikolić et al. 2012)** **(Tableaux 3 et VII)**. En stimulant modérément et en continu des myotubes en culture avec un programme EPS chronique basse fréquence durant 24 ou 48h, leurs capacités oxydatives sont accrues via une augmentation du métabolisme oxydatif du glucose et de la vitesse d'oxydation complète des acides gras, comme l'acide oléique. En revanche, toujours chez Nikolić et al., l'absorption d'acide oléique semble rester inchangée après 48 h de stimulation EPS **(Nikolić et al. 2012)**, alors qu'il a été démontré ailleurs que l'AP permet d'augmenter l'absorption des acides gras chez l'Homme. Les mécanismes moléculaires impliqués dans cette élévation de consommation ne sont manifestement toujours pas bien définis puisque des incohérences persistent. Ces dernières sont dues à l'absence de standardisation dans les durée et les intensités des protocoles EPS mis en place par les différentes équipes de recherche.

En outre, après 48 h, ces changements fonctionnels dans les processus métaboliques s'accompagnent par un doublement du contenu des myotubes en mitochondries mesuré sur des cellules vivantes par microscopie avec un colorant fluorescent. Cet accroissement du volume et du nombre de mitochondries est aussi observé *in vivo* dans les MSS avec un entraînement d'endurance chronique. Ce dernier résulterait du cumul des augmentations transitoires en ARNm transcrits codant pour des protéines mitochondriales, suite à des séances d'AP chronique répétées. Toutefois, l'augmentation du volume occupé par les mitochondries semble ne pas être accompagné d'une augmentation de l'activité enzymatique aussi rapide. Effectivement, l'activité de la citrate synthase (CS) a tendance à être amplifiée, sans pour autant être significative **(Nikolić et al. 2012)**. Les travaux de Nikolić et al. montrent que, bien que l'ARNm de la CS augmente très tôt dans le programme EPS chronique, basse fréquence, l'activité de cette enzyme n'augmente que bien plus tard. Il apparaît qu'en général, les salves transitoires et répétées d'ARNm sont produites dès les premiers moments du programme EPS, avant l'augmentation de l'activité des protéines mitochondriales. Toutefois, l'ampleur des réponses des différentes protéines mitochondriales et facteurs transcriptionnels varie considérablement selon le moment du programme EPS. Ainsi, l'absence d'augmentation significative de l'activité de la CS après seulement 48 h de stimulation pourrait être en accord, ou du moins refléter la complexité temporelle des différents événements moléculaires qui s'enchaînent durant la biogenèse mitochondriale **(Nikolić et al. 2012)**. Un temps de stimulation supérieur à 48 h serait ainsi nécessaire pour mener à terme ce processus.

Le motif d'expression des gènes obtenu après un programme EPS sur des myotubes s'est montré qualitativement très proche de celui du muscle entraîné *in vivo* avec une intensité modérée, mais pas de celui du muscle entraîné avec une intensité aiguë **(Burch et**

al. 2010). De toute évidence, une session unique de stimulation EPS sur les myotubes en culture ne permet pas de rendre compte de la complexité et de l'adaptation du MSS au cours du temps avec l'AP *in vivo*. Il est également important de noter que l'adaptation du muscle à l'entraînement chronique confère bien plus de bienfaits pour la santé que celle du muscle à l'exercice aigu.

Gogh et al. sont allés vérifier si les effets de l'EPS sur les myotubes C2C12, comme la sécrétion de myokines telles que l'IL-6 et l'activation de l'AMPK par phosphorylation, sont bien causés par les contractions et non à des changements dans le milieu de culture (**Gogh et al. 2015**). Il ressort de leur étude que ces effets sont bien dus principalement à l'activité contractile. Ainsi, la stimulation EPS resterait une méthode pertinente pour mimer l'AP. Cependant, Gogh et al. ont également observé un effet du milieu stimulé par EPS sans myotubes sur une lignée d'hépatocytes. Cette observation amène des interrogations concernant un biais potentiel. Aucun article ne s'est encore penché sur un effet du milieu contenant les myotubes sur des tumeurs ou des lignées de cellules tumorales. Ces observations indiquent qu'il convient de rester prudent et de construire les protocoles de façon à toujours prendre en compte les modifications indépendantes des myotubes, par exemple en utilisant un MC sans myotubes comme contrôle expérimental si l'on étudie les effets d'un MC contenant un sécrétome de myotubes électrostimulés sur des lignées de cellules tumorales.

## 3.5. Limites rencontrées dans les modèles EPS

Il y a un intérêt important à explorer les différentes méthodes d'électrostimulation et à élargir nos connaissances sur les phénomènes cellulaires qui en résultent. Cependant, comme l'ont récemment souligné Xiong et al., les progrès dans ce domaine sont lents, et ce pour différentes raisons. D'une part, les techniques et les paramètres de stimulation utilisés jusqu'alors n'ont pas été standardisés. D'autre part, les approches actuelles reposent sur l'utilisation d'électrostimulateurs à faible débit avec une faible variabilité de fréquence (**Xiong et al. 2015**). A l'avenir, ce type de dispositif devrait connaître encore certaines améliorations. Certaines perspectives en particulier paraissent particulièrement intéressantes. Comme le fait de pouvoir envisager combiner EPS et "stretch" mécanique, EPS et hypoxie temporaire (**Burch et al. 2010**) ou encore EPS et construction tridimensionnelle mimant la MEC. Ces différentes avancées devraient contribuer à améliorer l'imitation de l'environnement cellulaire *in vitro*, afin que les conditions de culture des myotubes se rapprochent le plus possible des conditions *in vivo*.

Les protocoles EPS aigus de haute fréquence actuellement développés présentent le désavantage d'être rapidement délétères pour les myotubes. De ce fait, il est préférable d'ajouter des temps de récupération dans les sessions de ces programmes. Ce délai de récupération a pour objectif de permettre la restauration des stocks de calcium ($Ca^{2+}$) dans les réticulums sarcoplasmiques et de préserver l'adhérence des myotubes au milieu ou à la surface de culture. Orfanos et al. ont fixé de délai à 5 secondes (**Orfanos et al. 2016**) (**Tableau VI**).

*In vivo*, Les niveaux d'expression des gènes des MyHC sont utilisés pour classer les fibres musculaires en différents types **(Tableau IX)**. Bien que la proportion relative de ces types de fibres soit en majeure partie régulée par les motoneurones, d'autres facteurs régulateurs existent, comme des prédispositions génétiques et des phénomènes d'impregnation génomique parentale due à la méthylation différentielle de l'ADN **(Burch et al. 2010)**. Cependant, les lignées de cellules musculaires cultivées *in vitro* ne présentent pas des profils d'expression des isoformes de MyHC permettant de les classer dans ces différents types. Cette absence de typologie *in vitro* serait due à l'absence d'innervation par les neurones moteurs. L'EPS permettrait de se substituer partiellement à ces derniers. En effet, une augmentation de l'expression de certaines isoformes de MyHC chez des myotubes C2C12 stimulés par EPS a été observée **(Burch et al. 2010)**. De même, chez des myotubes humains, Nikolić et al. ont évalué les effets de la stimulation EPS chronique, basse fréquence sur l'expression des marqueurs des fibres musculaires de type lentes et oxydatives (ST), l'isoforme β de la MyHC (MyHC-β/lent), et des fibres musculaires de type rapides et glycolytiques (FT), les isoformes II de la MyHC (MyHC-II). Dans ces conditions de stimulation, L'expression de la MyHC-β est augmentée et celle des MyHC-II est diminuée. Il en résulte donc que le ratio des niveaux d'ARNm de MyHC-β sur MyHC-II tend à augmenter dans ce type de programme. Au bout de 24 ou 48 h d'électrostimulation, l'expression de MyHC-β a été augmentée de 45% **(Nikolić et al. 2012)**. Il conviendrait d'avoir également ce types de données chez des myotubes murins C2C12, et aussi pour des programmes EPS aigus de haute fréquence.

Ces données suggèrent qu'avec un protocole EPS adapté, par exemple avec des stimulations lentes, rapides, continues ou sporadiques, certains types de fibres peuvent être favorisés dans ces cellules en culture. Toutefois, l'EPS seul ne semble pas être pas suffisant pour orienter totalement les myotubes vers telle ou telle typologie. Néanmoins, l'EPS peut aussi être envisagée en combinaison avec d'autres approches telles que l'ajout d'extraits de muscles lents ou rapides, ou bien encore l'application d'un léger stress thermique en continu **(Burch et al. 2010)**. De même, placer les myotubes à électrostimuler en co-culture avec des motoneurones pourrait tout aussi bien jouer sur la typologie et renforcer par la même occasion la comparabilité du modèle avec le muscle *in vivo.* La stimulation EPS de cellules musculaires pourrait ainsi être utilisée pour étudier les propriétés spécifiques des différents types de fibres musculaires. Ces apports et ces modifications sur le modèle EPS pourraient permettre d'augmenter l'activation des différentes voies de signalisation qui convergent sur PGC-1α dans le muscle entraîné. Cette augmentation d'activation pourrait être testée en quantifiant l'activation de ces voies de signalisation, comme la phosphorylation de l'AMPK et de ses cibles cellulaires.

En plus de l'absence d'innervation et d'activation par les motoneurones, d'autres stimuli impliqués dans l'adaptation à l'entraînement, comme le milieu hormonal, sont également absents. D'autre part, les niveaux des protéines enzymatiques et des facteurs fonctionnels qui sont utilisés comme marqueurs, comme par exemple ceux impliqués dans la phosphorylation oxydative, i.e. l'ATP synthase (ATPsyn), le complexe I de la chaîne respiratoire (NADH-Coenzyme Q oxydoréductase) et le complexe IV (Cytochrome c oxydase), peuvent différer entre les myotubes en culture et le MSS *in vivo* **(Burch et al. 2010)**.

Pour conclure, la stimulation EPS de myotubes en culture ne permet pas de refléter totalement la complexité de l'adaptation du MSS à l'AP *in vivo* et au cours du temps. Cette complexité rend rudimentaire la compréhension actuelle des processus moléculaires impliqués dans la plasticité des fibres musculaires, de leur capacité à procéder à un remodelage de leur cytosquelette ainsi que du contenu en isoformes de protéines spécifiques en réponse à des changements de type ou de taux d'activité. L'absence d'activation neuronale et d'hormones constituent également des biais importants qui empêchent de transposer au *in vivo* les observations faites *in vitro*. Les niveaux ou les états d'activation des protéines étudiées par méthode immuno-enzymatique ELISA ou Western-Blot (WB) diffèrent ainsi bien souvent entre le *in vivo* et le *in vitro*.

# Synthèse et objectifs

**Synthèse:**

La littérature scientifique nous indique que l'AP, qu'elle soit chronique et d'intensité modérée ou ponctuelle et de haute intensité, peut être mimée *in vitro* grâce au système EPS. Cette approche rend possible la réalisation d'études plus poussées sur le sécrétome des MSS à l'exercice ainsi que sur les différents mécanismes moléculaires mis en jeu. Toutefois, une absence de standardisation dans les techniques et les paramètres de stimulation et des conditions trop différentes entre le *in vivo* et le *in vitro* empêchent de transposer les observations d'un modèle à un autre. Différentes solutions ont été formulées et pourront sans doute s'appliquer à l'avenir, comme le fait de coupler l'EPS à de la contrainte mécanique et à un Matrigel®. Ce manque de standardisation se retrouve également dans le choix des milieux de croissance et de différenciation, ainsi que des sérums et des temps de différenciation. Avant de débuter le protocole EPS, Il apparaît ainsi essentiel de vérifier que les modalités de culture et de différenciation choisies permettent bien une complète différenciation des myocytes en myotubes.

Selon le type de programme EPS appliqué, les myotubes C2C12 peuvent être utilisés pour obtenir un sécrétome composé de différentes myokines. Ce sécrétome, une fois isolé, pourrait être utilisé comme traitement sur des lignées de cellules tumorales en culture, comme le carcinome du côlon murin C26 ou encore des modèles de cancers du sein murins. Cela permettra ainsi d'étudier ses effets sur différents cancers ainsi que les mécanismes moléculaires impliqués. De plus, au regard des bienfaits des différents types d'AP contre les cancers, l'adaptation du muscle à l'AP chronique d'intensité modérée à soutenue confère bien plus de bénéfices que celle du muscle à l'AP aiguë d'intensité soutenue. Il ressort ainsi de la revue de littérature que le sécrétome dont l'étude présente le plus grand intérêt vis-à-vis des cancers est celui qui se retrouve lorsque de l'AP chronique d'intensité modérée est mimée. De plus, les précédentes études indiquent également qu'il est plus facile de réussir à retrouver par stimulation EPS *in vitro* les biomarqueurs caractéristiques du muscle entraîné de manière chronique en intensité modérée que celui du muscle entraîné de façon aiguë avec une intensité soutenue. Ces constats rendent nettement plus intéressant le fait de développer en priorité un programme EPS capable de mimer l'AP chronique d'intensité modérée et ses effets sur des myotubes murins C2C12. La protéine PGC-1α, le ratio de MyHC1 sur MyHC2a, l'activation de l'AMPK ainsi que la synthèse et la sécrétion d'IL-6 pourraient alors être utilisés comme des biomarqueurs permettant de déterminer que l'activité de contraction produite correspond bien au type d'AP que l'on souhaite imiter.

**Objectifs:**

L'objectif principal de ce mémoire est de mettre en place un modèle EPS *in vitro* sur des myotubes qui soit le plus possible capable de mimer l'AP chronique d'intensité modérée et ses effets *in vivo*. A terme, cela dans le but de récupérer le sécrétome des myotubes et étudier ses effets. Il est possible de compléter cet objectif en remplissant deux sous-objectifs. D'une part, en établissant une méthode permettant de vérifier que les myotubes que l'ont souhaite électrostimuler sont complètement différenciés et sont capables d'avoir une réponse contractile. D'autre part, en vérifiant que les modifications induites par le programme EPS choisi reflètent bien les effets de l'AP que l'on souhaite imiter.

# Protocole proposé

Cette partie rend compte du matériel, des méthodes ainsi que des modalités des manipulations envisagées. Pour le moment il s'agit donc dans un premier temps de tenter de reproduire les effet d'une AP chronique d'intensité modérée dans un modèle de stimulation EPS de myotubes en culture. La présence ou non de ces effets est étudiée par détection de différents biomarqueurs intrinsèques ou extrinsèques précédemment évoqués dans la revue de littérature.

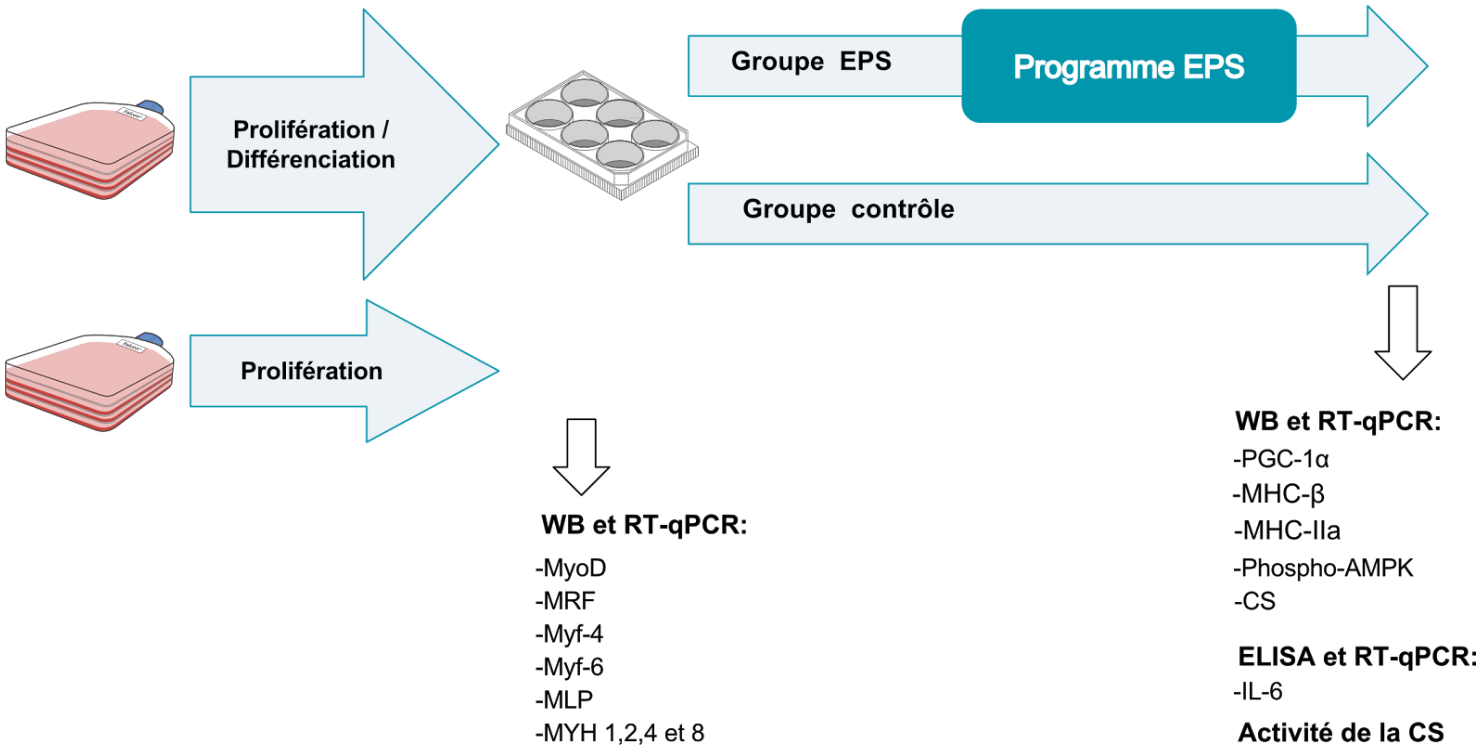



**Figure 4: Design de la démarche expérimentale**

## 1. Culture cellulaire

Les myocytes murins C2C12 sont obtenus auprès de ATCC (CRL-1772) et sont cultivés dans 500 ml de milieu de culture DMEM (4,5 g/l de glucose ; 345 ml ; Sigma-Aldrich) additionné de 20% de FBS (200 µg/ml ; 100 ml ; Gibco) **(van der Schaft et al. 2013)**, de P/S (10% ; 100 µg/ml ; 50 ml ; ATCC) **(Gogh et al. 2015)** et de L-glutamine (1% ; 10 µg/ml ; 5 ml ; Sigma-Aldrich) à l'intérieur d'une flasque de 25 cm² (Corning) et maintenus à 37°C en atmosphère humide contenant 5% de $CO_2$. Les cellules sont cultivées ainsi jusqu'à atteindre 90% de confluence et le milieu est changé toutes les 24 h **(Burch et al. 2010)**.

Les cellules sont ensuite récoltées par ajout d'une solution de trypsine-EDTA (Gibco) et centrifugées à 1 000 rpm **(van der Schaft et al. 2013)**. Elles sont repiquées dans une plaque de culture 6 puits de 35 mm de diamètre et 8 $cm^2$ de surface (C-Dish, IonOptix). Un milieu de différenciation vient remplacer le milieu de croissance. Ce milieu est également composé de DMEM et complémenté avec du HS (2% ; 20µg/ml ; Gibco/Life Technologies)

(**Burch et al. 2010**) de la P/S (10%), et de la L-glutamine (1%). La différenciation dure 6 jours et le milieu de différenciation est changé toutes les 24 h. Après la phase de différenciation, les myotubes sont laissés reposer dans un milieu DMEM sans aucun sérum pendant une nuit, puis le lendemain le milieu sans sérum est renouvelé juste avant le début du protocole EPS (**Gogh et al. 2015**).

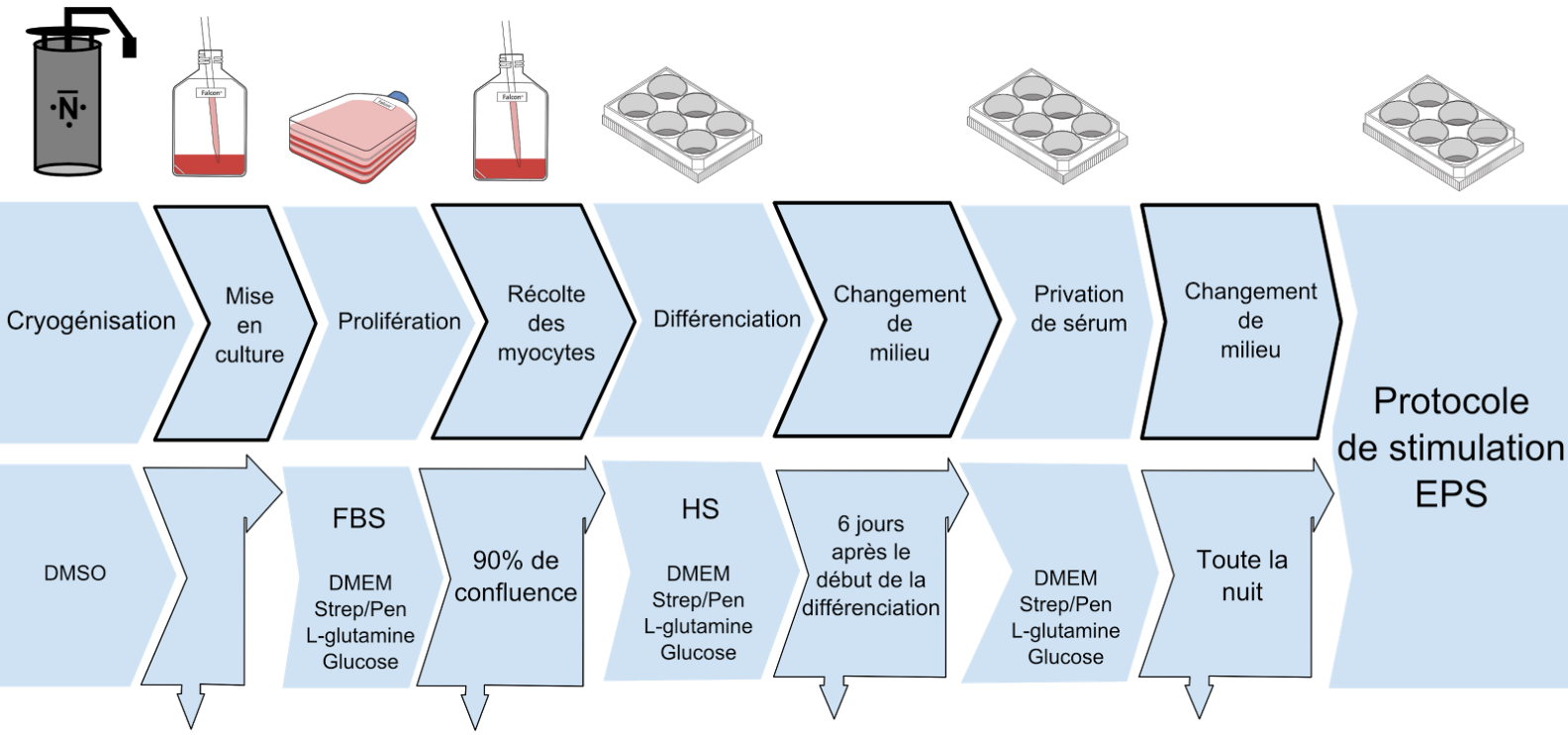



**Figure 5: Protocole de culture et de différenciation des myocytes C2C12**

## 2. Vérification de la différenciation des myoblastes en myotubes

Dans un premier temps, il convient de s'assurer à la fin de l'étape de différenciation que le mode de culture et de différenciation mis en place permet bien une complète différenciation des myoblastes en myotubes. Pour ce faire, un échantillon de lysat cellulaire total est récupéré et la quantité des protéines impliquées dans le processus de maturation musculaire (MyoD, Myf-4, Myf-6, MLP, MYH 1, 2, 4 et 8) est évaluée par WB. Les valeurs trouvées sont comparées aux valeurs d'un groupe contrôle de myocytes en culture non différenciés.

Si les résultats de ces WB sont bien ceux attendus, il sera possible d'aller confirmer ou non ces tendances en utilisant une autre partie du lysat cellulaire total des myotubes pour réaliser des RT-qPCR afin d'étudier les niveaux d'expression des ARNm des gènes de ces protéines. En revanche, si les résultats obtenus ne sont pas ceux escomptés, il conviendra de revoir les modalités de culture et de différenciation avant de débuter les expériences de stimulation EPS.

Cette différenciation complète est également censée se caractériser par une réponse contractile à des stimuli électriques. Ainsi, cette réponse contractile peut aussi éventuellement être vérifiée par examen au microscope durant une électrostimulation, selon le protocole de Silveira et al. **(Silveira et al. 2006)**.

# 3. Stimulation EPS

Les myotubes sont séparés en 2 groupes répartis en 2 plaques de culture 6 puits, un groupe avec stimulation EPS sur une plaque équipée d'électrodes en carbone et un groupe contrôle sur une plaque sans électrodes. Le programme EPS choisi permet d'imiter une AP de type modérée et chronique sur les myotubes C2C12, d'après les éléments analysés et comparés dans la revue de littérature, il conviendrait de s'orienter vers une électrostimulation en continu durant 48 h ou 72 h afin de laisser le temps aux changements enzymatiques mitochondriaux de se mettre en place **(Nikolić et al. 2012)**. L'intensité de voltage qui semble la plus adaptée pour ce type de stimulation apparaît être compris entre 11,5 V **(Lambernd et al. 2012)** et 14V **(Gogh et al. 2015)**, à une fréquence de 1 Hz **(Lambernd et al. 2012)** et une durée d'impulsion de 2ms **(Lambernd et al. 2012)**. Le MC et les myotubes sont récupérés juste après l'électrostimulation. Les cellules sont détachées et lysées à l'aide d'un grattoir et d'une solution trypsine-EDTA (Gibco).

# 4. Analyse du contenu des myotubes et du MC après stimulation EPS

Suite à la stimulation EPS, le MC et les myotubes sont récupérés séparément. Les cellules sont détachées de la plaque et lysés par friction à l'aide d'un grattoir dans un tampon de lyse (PBS 0,2 X ; Triton X100 1%). Le MC est centrifugé, puis placé en congélation à -80°C. Les échantillons de lysat cellulaire total obtenus sont utilisés pour réaliser des WB et des RT-qPCR. Cex expériences permettent d'étudier les concentrations relatives et l'expression des gènes des différents marqueurs intrinsèques que l'on sait augmentés en réponse à une AP chronique de d'intensité modérée D'autres échantillons sont aussi utilisés pour mesurer l'activité de l'enzyme CS. Le MC est quant à lui utilisé pour réaliser des tests ELISA.

Les WB visent à déterminer la concentration relative de PGC-1α **(Burch et al. 2010)**, de la protéine mitochondriale CS **(Nikolić et al. 2012)**, le ratio des protéines MyHC1 / MyHC2a **(Nikolić et al. 2012)** ainsi que l'activation de l'AMPK par phosphorylation sur sa Thréonine 172 **(Lambernd et al. 2012)**. La méthode immuno-enzymatique ELISA permet de déterminer la concentration d'IL-6 dans le MC **(Lambernd et al. 2012)**. Enfin, la RT-qPCR permet d'étudier les niveaux d'ARNm des gènes de ces différentes protéines.

## 4.1. Détection et dosage de l'IL-6 par méthode ELISA

La méthode la plus appropriée pour détecter et doser une protéine présente dans le MC n'est pas la méthode WB mais la méthode ELISA. La sécrétion d'IL-6 dans le MC par les myotubes est ainsi étudiée par méthode ELISA sandwich **(Lambernd et al. 2012)**. Comme dans le protocole de Gogh et al., un kit ELISA dirigé contre l'IL-6 murine (KMC0062

; Gibco) est utilisé. Les manipulations et les mesures sont effectuées en suivant le protocole donné par le fournisseur.

Un anticorps (Ac) de capture de l'IL-6 est dilué (ab7737 ; Abcam) dans un tampon de revêtement à une concentration de 0,5-8 µg/ml. 100 µl de de cette solution est ajoutée dans chaque puit d'une plaque 96 puits. La plaque est scellée et laissée à incuber durant une nuit à 4°C, puis ramenée à température ambiante et la solution contenant les Ac de capture toujours non fixés est retirée. Après 3 lavages à l'aide d'une solution PBS/Tween, 200 µl d'une solution de blocage sont ajoutés dans chaque puits. La plaque est de nouveau scellée et laissée à incuber à température ambiante pendant environ 1 h puis relavée 3 fois. Après dilution à la concentration désirée dans une solution de blocage, la solution standard et les échantillons sont alors ajoutés par volume de 100 µl dans les puits, en duplicat ou en triplicat. La solution standard est diluée en série afin de générer une courbe de dilution standard qui sert de gamme étalon. La plaque est scellée et incubée à température ambiante pendant 2-4 heures sous agitation. La plaque est nettoyée 3-5 fois avec une solution PBS/Tween, puis un Ac de détection (ab84270 ; Abcam) marqué à la biotine est dilué dans le tampon de blocage, à une concentration comprise entre 0,25 et 1 µg/ml et 100 µl sont ajoutés dans chaque puits. La plaque est de nouveau scellée et incubée à température ambiante pendant 1 heure, lavée 3-5 fois avec une solution de PBS-Tween, puis de la HRP complexée à l'avidine (Av-HRP ; Biolegend) diluée dans du tampon de blocage est ajoutée à raison de 100 µl par puit. La plaque est scellée et incubée à température ambiante pendant 1 heure, nettoyée 3-5 fois avec une solution PBS/Tween, puis 100 µl du réactif TMB (6 ml de réactif A et 6 ml de réactif B mélangés juste avant) est ajouté dans chaque puits et laissé incuber à température ambiante durant 4-30 min, afin de laisser le temps à la solution de se colorer sous l'effet des réactifs. Enfin, 100 µl de solution Stop sont ajoutés dans chaque puits ($2NH_2SO_4$ ou 1 M de $H_3PO_{4-}$). La densité optique (DO) est lue pour chaque puits avec un lecteur de microplaque configuré pour une lecture à 450 nm.

## 4.2. Mesure de l'activité enzymatique de la citrate synthase

Les expériences de WB et de RT-qPCR n'apportent que des information quantitatives sur la CS. Elle ne rendent en aucun cas compte de son activité enzymatique. Or, comme rapporté dans la revue de littérature, l'augmentation des protéines mitochondriales n'est pas accompagnée d'une augmentation aussi rapide de leur activité. Ce décalage entre niveau d'expression et activité est particulièrement marqué dans le cas de la CS **(Nikolić et al. 2012)**. C'est pourquoi il conviendrait également de tester l'activité de cette enzyme en plus des expériences précédemment décrites. Ce test permettra ainsi de compléter les données sur l'effet du programme EPS sur la concentration et le fonctionnement des mitochondries.

L'activité de la CS est évaluée par mesure sur spectrophotomètre en utilisant un réactif, le réactif d'Ellman (DTNB) qui colore la solution au contact de la CoA-SH, l'un des produits de la réaction catalysée par la CS. Le coefficient d'extinction molaire utilisé pour détecter le complexe CoA-SH-DTNB à 412 nm est de 13,600 l.mol-1.cm-1. La solution utilisée est composée d'un tampon pH triéthanolamine-HCl (100 nM), de DTNB (100 M), de

détergent Triton-X (0.25% vol/vol), des substrats de la CS, i.e. l'oxaloacétate (0.5 mM) et l'acétyl-CoA (0.31 mM) avec un pH ajusté à 8,0. 10 µl de lysat cellulaire total et 990 µl de la solution de réaction sont ajoutés et homogénéisés dans une cuve de spectrophotomètre. Les valeurs d'absorbance sont mesurées toutes les 15 s pendant 3 min afin de déterminer le pic d'activité de la CS. La vitesse initiale (V0) de la CS peut également être déterminée à des concentrations de substrats choisies différentes et en mesurant l'absorbance (DO) toutes les 5 sec. Toutes les analyses sont menées à une température ambiante de 21°C. La CS cardiaque porcine (C3260 –200UN, Sigma-Aldrich, UK) est utilisée comme étalon pour la calibration du spectrophotomètre.

## 5. Dosage des protéines et Western-Blots

La concentration des protéines dans les échantillons de lysat cellulaire est d'abord déterminée à l'aide de la méthode de Bradford. Cette méthode est basée sur la réaction colorimétrique entre le bleu de Coomassie et les protéines (Bio Rad). La forme cationique du réactif est rouge/brun alors que la forme anionique tend vers le bleu et possède un pic d'absorption maximale autour de 595 nm. Une gamme étalon est créée à l'aide d'une solution BSA. Après avoir déposé 200 µl d'échantillon en triplicats puis laissé incuber la plaque 96 puits durant 10 min, l'absorbance est mesurée à 595 nm sur un lecteur microplaque.

| Anticorps primaire | Hôte | Dilution | Référence |
|---|---|---|---|
| anti-PGC-1α | Lapin | 1/1000 | sc-13067 ; Santa Cruz |
| Anti-CS | Lapin | 1/1000 | #14309 ; Cell Signaling |
| Anti-MyHC-β | Lapin | 1/500 | ab173366 ; Abcam |
| Anti-MyHC-IIa | Lapin | 1/10000 | ab124937 ; Abcam |
| anti-Phospho-AMPKα (Thr172) | Lapin | 1/1000 | #2531 ; Cell Signaling |
| Anti-MyoD | Lapin | 1:1000 | sc-304 ; Santa Cruz |
| Anti-Myf-4 | Lapin | 1/1000 | ab82843 ; Abcam |
| Anti-Myf-6 | Lapin | 1/1000 | ab82842 ; Abcam |
| Anti-MLP | Lapin | 1/1000 | PA5-29155 ; Gibco |
| Anti-MyHC-IIb | Lapin | 1/2000 | MP4541 ; ECM BioSciences |
| Anti-MyHC-pn | Lapin | 1/1000 | LS-C336250 ; LifeSpan BioSciences |

**Tableau 4: Anticorps primaires utilisés pour les WB**

A partir de là, un volume d'échantillon de lysat cellulaire correspondant à 150 µg de protéines totales est déposé et séparé sur un gel dénaturant de polyacrylamide à 12,5% (SDS-PAGE) après avoir été mélangé à un tampon de dépôt. Une fois la migration terminée et le transfert sur membrane de nitrocellulose réalisé, cette dernière est bloquée à l'aide d'une solution de TBS-T-L composée de Tris-HCl (50 mM ; pH 8), de NaCl (150 mM), de Tween 20 (0,1% ; Sigma-Aldrich) et de lait écrémé (8% ; Régilait) durant 1 h à température ambiante. Après cette étape de saturation, les protéines d'intérêt sont hybridées avec des Ac primaires, à 4°C sous agitation. Les Ac primaires sont dilués dans du TBS-T-L **(Tableau 4)**. Un marquage de la protéine de ménage ubiquitaire glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH), dont la concentration est reconnue comme inchangée quelles que soient les circonstances, permet de servir de contrôle interne et de normaliser les WB entre eux (anti-GAPDH ; Lapin ; 1/2,500 ; ab9485 ; Abcam).

Après trois rinçages successifs de 5 min de la membrane dans du TTBS 1X pour la débarrasser de la solution contenant les Ac primaires, elle est de nouveau incubée durant 45 min en présence d'un Ac secondaire couplé à la HRP (mouse anti-rabbit IgG-HRP ; sc-2357 ; Santa Cruz) dilué dans du TBS-T-L. La membrane est ensuite de nouveau rincée 3 fois et les bandes immunoréactives contenant les protéines d'intérêt sont révélées par imagerie infrarouge avec le système Odyssey LI-COR (Biosciences). Les valeurs trouvées sont comparées aux valeurs d'un groupe contrôle de myotubes non électrostimulés

Ces analyses viennent compléter la détection d'IL-6 dans le MC par ELISA. En considérant que les résultats obtenus pour les expériences de WB et d'ELISA soient bien ceux attendus, il sera alors possible de confirmer que le programme EPS utilisé permet bien d'imiter l'AP chronique d'intensité modérée. Dans un tel cas de figure, pour aller plus loin dans l'analyse, et confirmer ou non les tendances observées par ces méthodes, une autre partie du lysat cellulaire total des myotubes peut être utilisée pour étudier par RT-qPCR les niveaux d'expression des ARNm des gènes de ces mêmes biomarqueurs.

## 7. RT-qPCR

Les ARN totaux des myotubes sont extraits en utilisant du réactif TRIzol (Invitrogen ; 400 µl). En premier lieu, la quantité et la qualité de ces ARN totaux sont mesurés avec un spectromètre NanoDrop ND-1000 et son integrité est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose dénaturant classique.

A partir de là, des RT-qPCR sont réalisées afin d'étudier l'expression relative des ARNm des différents gènes que l'on sait augmentés en réponse à une AP chronique de basse intensité. La transcription inverse est réalisée sur 1 µg des ARN totaux en utilisant la transcriptase inverse (RT) SuperScript® II (Gibco) ainsi que des amorces oligo(dT) (Gibco) en présence de nucléotides (nt). Les PCR effectuées par la suite utilisent chacune 0,5 µl de l'ADNc obtenu par rétrotranscription des ARNm. Ce volume est ajouté à une solution contenant également du tampon PCR 10X (5 µL), du mix dNTP (2 µl ; dATP, dTTP, dCTP, dGTP), les amorces sens (2 µl) et anti-sens (2 µl) et l'enzyme Taq polymérase de l'ADN (GoTaq) mélangée à son co-facteur enzymatique MgCl2 (0, 25 µl). Cette solution est

complétée à 50 µl avec de l'eau milliQ dans un tube eppendorf de 500 µl, vortexée puis placée dans un thermocycleur.

Le nombre de cycles, leur durée et leur température varient selon les amorces utilisées. Les séquences de ces amorces pour la partie amplification par PCR sont présentées dans le tableau ci-dessous (**Tableau 5**). Les niveaux d'expression sont normalisés à partir de l'expression de 2 gènes de ménage, HPRT1 et RPLPo. Les produits de PCR sont détectés après électrophorèse sur gel d'agarose par coloration de l'ADN au bromure d'éthidium. Les valeurs trouvées sont comparées aux valeurs d'un groupe contrôle de myotubes non électrostimulés.

| Gène | Amorces |
|---|---|
| IL-6 | **Sens:** 5'-CATCCAGTTGCCTTCTTGGG-3' ; **Anti-sens:** 3'-CCAGTTTGGTAGCATCCATC-5' |
| PGC-1α | **Sens:** 5'-AAACTTGCTAGCGGTCCTCA-3' ; **Anti-sens:** 3'-TGGCTGGTGCCAGTAAGAG-5' |
| CS | **Sens:** 5'-GGAAGGCTAAGAACCCTTGG-3' ; **Anti-sens:** 3'-TCATCTCCGTCATGCCATAGT-5' |
| MyoD | **Sens:** 5'-ATCCGCTACATCGAAGGTCT-3' ; **Anti-sens:** 3'-CGCTGTAATCCATCATGCCA-5' |
| Myf-4 | **Sens:** 5'-CAGTGAATGCAACTCCCACA-3' ; **Anti-sens:** 3'-CGAGCAAATGATCTCCTGGG-5' |
| MRF4 | **Sens:** 5'-CTACATTGAGCGTCTACAGGACC-3' ; **Anti-sens:** 3'-CTGAAGACTGCTGGAGGCTG-5' |
| MLP | **Sens:** 5'-TTGGCCCAGAGTCTTCACCATG-3' ; **Anti-sens:** 3'-AGCAGGCAGCTTCACTCCTTC-5' |
| MYH1 | **Sens:** 5'-ATTTCTCTCTCTGCCAGGCA-3' ; **Anti-sens:** 3'-TCAAACTAGCCCCGCAGTG-5' |
| MYH2 | **Sens:** 5'-CTGTACAAAGATCTGCTGT-3' ; **Anti-sens:** 3'-CAAGTCAGCGAGTGACCA-5' |
| MYH4 | **Sens:** 5'-TCTGTCACTCGGTGCTTCC-3' ; **Anti-sens:** 3'-AGGGTTTTTGGAGGCTGTTT-5' |
| MYH7 | **Sens:** 5'-GTGACAACAGCCCTTTCTAAAT-3' ; **Anti-sens:** 3'-CTCCAGCTCCCACTCCTACC-5' |
| MYH8 | **Sens:** 5'-ACACATCTTGCAGAGGAAGG-3'; **Anti-sens:** 3'-TAAACCCAGAGAGGCAAGTG-5' |
| HPRT1 | **Sens:** 5'-CCTAAGATGAGCGCAAGTTGAA-3' ; **Anti-sens:** 3'-CCACAGGACTAGAACACCTGCTAA-5' |
| RPLPo | **Sens:** 5'-ACCTCCTTCTTCCAGGCTTT-3' ; **Anti-sens:** 3'-ACCTCTTTCTTCCAAGCTTT-5' |

**Tableau 5: Amorces utilisées pour les RT-qPCR**

## 9. Analyses statistiques

Les bandes d'intérêt des Western Blot sont quantifiées relativement par rapport au blot de la GAPDH à l'aide du logiciel BIO-1D. Ces résultats sont exprimés en moyenne ± l'erreur standard à la moyenne (ESM) de n=3 expériences. Les différences entre les groupes de données sont analysées à l'aide d'un test U non paramétrique de Mann-Whitney à l'aide du logiciel GraphPad Prism. Une valeur de p inférieure à 0,05 est admise pour que les

différences entre les données soient considérées comme significatives. Les données obtenues par RT-qPCR et ELISA sont quant à elles analysées en utilisant le test-t de Student (Logiciel GraphPad Prism 5.0 pour Windows, GraphPad Software Inc., San Diego, CA).

# Résultats attendus

L'expression des ARNm des marqueurs MyoD, MRF, Myf-4, Myf-6, MLP, MYH 1,2,4 et 8 devrait être augmentée après la différenciation des myotubes. Ce qui permettra de confirmer que les modes de culture et de différenciation des myocytes C2C12 qui ont été choisis sont appropriés. Ensuite, après 48 h de stimulation EPS en continu à 1 Hz, la quantité de protéines PGC-1α devrait être augmentée significativement, comme suggéré par Burch et al. (**Burch et al. 2010**). Cette augmentation devrait également se retrouver chez les protéines IL-6 (**Lambernd et al. 2012**), CS et MyHC-β. La quantité des protéines MyHC-IIa peut également se montrer augmentée, mais le ratio MyHC-β / MyHC-IIa devrait largement rester en faveur de MyHC-β (**Nikolić et al. 2012**). La quantité de protéine AMPK phosphorylée sur la thréonine 172 sera aussi augmentée (**Lambernd et al. 2012**). L'expression des ARNm est également augmentée pour les gènes de ces mêmes biomarqueurs, ce qui montre bien que l'augmentation des protéines est bien liée à une augmentation de l'activité de la transcription de leurs gènes et non à une augmentation de la durée de vie des protéines étudiées. Qui serait due par exemple à une diminution de la dégradation par le système ubiquitine-protéasome. De même, comme suggéré par Nikolić et al., l'activité de la protéine mitochondriale CS apparaît être plus forte, mais cette augmentation est moins marquée que celle de sa concentration intrinsèque (**Nikolić et al. 2012**).

Toutefois ces données ne permettent aucunement de savoir si l'augmentation de la quantité d'enzymes et de l'activité mitochondriale est accompagnée d'une augmentation du nombre ou du volume des mitochondries. Il existe une autre approche, basée sur de l'imagerie par microscopie confocale couplée à l'utilisation d'un marqueur fluorescent spécifique des mitochondries actives (MitoTracker® rouge FM) (**Nikolić et al. 2012**), qui permettrait d'évaluer la quantité de mitochondries et leur activité. Il pourrait ainsi aussi être pertinent de réaliser ce type d'observation sur les myotubes vivants après électrostimulation, mais cela n'est pas envisagé pour le moment.

L'augmentation du ratio MyHC-β / MyHC-IIa reflèterait une adaptation de typologie des fibres musculaires qui tend vers une augmentation de la proportion des fibres ST par rapport aux fibres FT. Cette adaptation se retrouve également chez les MSS sous l'effet d'une AP chronique d'endurance. De plus, la hausse d'AMPK activée et de PGC-1α suggèrerait une augmentation de la biogenèse mitochondriale dans les myotubes. Ce constat serait alors renforcé par l'augmentation de la quantité de l'enzyme mitochondriale CS, dont l'activité serait également augmentée. Ces variations d'expression étant les mêmes que celles observées dans l'adaptation des MSS à l'AP répétée d'intensité modérée, ces données devraient permettre de confirmer que le protocole EPS permet de mimer les effets de ce type d'AP. En revanche, si les résultats obtenus ne sont pas ceux attendus, il conviendra de revenir sur le choix des paramètres de stimulation EPS avant de pouvoir poursuivre plus loin et d'envisager de construire un projet autour de ce protocole EPS.

# Conclusion et perspectives

Les effets du sécrétome sur différentes lignées de cellules cancéreuses pourraient faire l'objet d'étude ultérieures. En particulier en se penchant sur les rôles de l'IL-6, de SPARC et d'OSM. Par exemple il serait possible d'étudier les effets d'un sécrétome contenant SPARC sur des lignées de cellules tumorales de carcinome du côlon, comme C26. En observant en particulier des paramètres tels que la prolifération ou le processus métastatique. Toutefois, ces modèles de cellules tumorales en culture ne permettent ni l'étude de la MEC ni de l'angiogenèse. Ainsi les effets de SPARC sur le remaniement de la MEC **(Lindner et al. 2015)** ne peuvent pas être abordés. Cette limite empêche également de pouvoir se pencher sur les effets d'autres myokines sur les cancers qui sont médiés par des modifications du microenvironnement tumoral, comme c'est par exemple le cas pour la protéine CHI3L1 **(Ost et al. 2016)**. Vis-à-vis du cancer du sein, on peut s'interroger sur les effets combinés des myokines SPARC et OSM. Par exemple, sur un modèle murin de cancer du sein, en allant comparer les effets d'un sécrétome avec un ratio [SPARC] / [OSM] faible par rapport aux effets d'un sécrétome avec un ratio [SPARC] / [OSM] élevé. Il est en théorie possible d'obtenir ces variations de ratio avec différents paramètres de stimulation EPS. Plus on tend vers une stimulation aiguë de haute fréquence, plus SPARC devrait être présent et plus on tend vers une stimulation chronique de basse fréquence, plus OSM devrait être produit et sécrété. Ces effets pourraient être étudiés sur des lignées de cellules de cancer du sein chez la souris, comme 4T1 ou E0771. Il conviendrait également d'étudier les interactions et effets potentiels de SPARC et de OSM l'un sur l'autre. Comme évoqué précédemment dans la revue de littérature, il apparaît aussi important de tenir compte des potentiels effets liés au MC sur les lignées de cellules tumorales qui seront étudiées **(Gogh et al. 2015)**. Par exemple en utilisant un MC sans myotubes stimulé par EPS comme contrôle négatif dans de futures expérimentations.

Il conviendrait également à terme de parvenir à transposer ce protocole de stimulation EPS sur des myotubes humains, comme l'ont fait Nikolić et al. **(Nikolić et al. 2012)** afin de pouvoir étudier directement les effets du sécrétome sur différents cancer directement chez l'Homme. Bien que la comparaison entre l'électrostimulation *in vitro* et l'électro-myostimulation (EMS) soit difficile, l'étude de la composition du sécrétome pour différentes AP mimées est également susceptible d'apporter un nouvel éclairage sur les possibilités d'applications de l'EMS. De plus, au delà de l'étude de l'effet de différents facteurs liés à l'exercice physique sur les cancers, ces derniers pourraient également permettre de tester de nouvelles approches pour traiter l'atrophie et les dystrophies musculaires **(Burch et al. 2010)**. En définitive, ces myotubes électrostimulés pourraient constituer un outil essentiel afin de mieux élucider les mécanismes moléculaires impliqués dans l'adaptation du muscle à l'AP ou à l'inactivité.

# Références bibliographiques


**Aoi**, Wataru, Yuji Naito, Tomohisa Takagi, Yuko Tanimura, Yoshikazu Takanami, Yukari Kawai, Kunihiro Sakuma, et al. 2013. « A Novel Myokine, Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine (SPARC), Suppresses Colon Tumorigenesis via Regular Exercise ». *Gut* 62 (6): 882‑89. doi:10.1136/gutjnl-2011-300776.

**Bachmann**, Patrick, Cédric Baudinet, Aude-Marie Foucaut, Anne-Sophie Kempf, Renaud Meyrand, Sophie Berthouze, Béatrice Fervers, et Marina Touillaud. 2015. « Activité physique pendant et après le cancer : comment prescrire et dans quels objectifs ? » *Nutrition Clinique et Métabolisme* 29 (2): 121‑25. doi:10.1016/j.nupar.2015.02.002.

**Bernard**, Paquito, Ahmed Jérôme Romain, et Mathieu Vergnault. 2015. « L'activité physique adaptée, une nécessité pour mettre en œuvre les recommandations ». *Nutrition Clinique et Métabolisme* 29 (2): 88‑90. doi:10.1016/j.nupar.2015.02.006.

**Brandt**, Claus, et Bente K. Pedersen. 2010. « The Role of Exercise-Induced Myokines in Muscle Homeostasis and the Defense against Chronic Diseases ». *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010. doi:10.1155/2010/520258.

**Burch**, Nathalie, Anne-Sophie Arnold, Flurin Item, Serge Summermatter, Gesa Brochmann Santana Santos, Martine Christe, Urs Boutellier, Marco Toigo, et Christoph Handschin. « Electric Pulse Stimulation of Cultured Murine Muscle Cells Reproduces Gene Expression Changes of Trained Mouse Muscle ». *PLoS ONE* 5, nº 6 (4 juin 2010). doi:10.1371/journal.pone.0010970.

**Carayol**, Marion. 2013. « Le rôle de l'activité physique dans la prévention tertiaire du cancer ». *Journal de Pharmacie Clinique* 32 (1): 23‑30. doi:10.1684/jpc.2013.0239.

**Coisne**, Tom. 2007. « Contribution à l'étude des effets de l'activité physique sur le fonctionnement mitochondrial et la production de radicaux libres - Etude sur mitochondries musculaires et hépatiques ». Phdthesis, Université Joseph-Fourier - Grenoble I. https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00626716/document.

**Courneya**, Kerry S., et Christine M. Friedenreich. 2011. « Physical Activity and Cancer: An Introduction ». *Recent Results in Cancer Research. Fortschritte Der Krebsforschung. Progrès Dans Les Recherches Sur Le Cancer* 186: 1‑10. doi:10.1007/978-3-642-04231-7_1.

**De Potter**. 2004. Cité dans « Définition, formation, législation et rôle du professionnel en activité physique adaptée », Alvéole 2010, Réhabilitation des patients atteints de pathologies respiratoires aiguës, D'après la communication de C. Fabre, Article rédigé par Chavignay E., (2010). Revue Maladie Respiratoire Actual 2 : 628-630, Édité par Elsevier Masson SAS.

**Desnoyers**, A., E. Riesco, T. Fülöp, et M. Pavic. 2016. « Activité physique et cancer : mise au point et revue de la littérature ». *La Revue de Médecine Interne*. Consulté le février 23. doi:10.1016/j.revmed.2015.12.021.

**Dreibati**, B., C. Lavet, A. Pinti, et G. Poumarat. 2011. « Characterization of an electric stimulation protocol for muscular exercise ». *Annals of Physical and Rehabilitation Medicine* 54 (1): 25‑35. doi:10.1016/j.rehab.2010.11.004.

**Emrani**, Ramin, Amélie Rébillard, Luz Lefeuvre, Arlette Gratas-Delamarche, Kelvin J. A. Davies, et Josiane Cillard. 2015. « The Calcineurin Antagonist RCAN1-4 Is Induced by Exhaustive Exercise in Rat Skeletal Muscle ». *Free Radical Biology & Medicine* 87 (octobre): 290‑99. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.023.

**Ferry**, A, et M Rieu. 1994. « Adaptation des systèmes physiologiques à l'activité physique ». *médecine/sciences* 10 (8‑9): 868. doi:10.4267/10608/2721.

**Foretz**, Marc, Nellie Taleux, Bruno Guigas, Sandrine Horman, Christophe Beauloye, Fabrizio Andreelli, Luc Bertrand, et Benoît Viollet. 2006. « Régulation du métabolisme énergétique par l'AMPK : Une nouvelle voie thérapeutique pour le traitement des maladies métaboliques et cardiaques ». *M/S : médecine sciences* 22 (4): 381‑88.

**Friedenreich**, Christine, Teresa Norat, Karen Steindorf, Marie-Christine Boutron-Ruault, Tobias Pischon, Mathieu Mazuir, Françoise Clavel-Chapelon, et al. 2006. « Physical Activity and Risk of Colon and Rectal Cancers: The European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition ». *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 15 (12): 2398‑2407. doi:10.1158/1055-9965.EPI-06-0595.

**Friedenreich**, Christine M. 2011. « Physical Activity and Breast Cancer: Review of the Epidemiologic Evidence and Biologic Mechanisms ». *Recent Results in Cancer Research. Fortschritte Der Krebsforschung. Progrès Dans Les Recherches Sur Le Cancer* 188: 125‑39. doi:10.1007/978-3-642-10858-7_11.

**Gaster**, M., H. Beck-Nielsen, et H. D. Schrøder. 2001. « Proliferation Conditions for Human Satellite Cells. The Fractional Content of Satellite Cells ». *APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica* 109 (11): 726‑34.

**Gogh**, Inkie J. A. Evers-van, Sheril Alex, Rinke Stienstra, Arjan B. Brenkman, Sander Kersten, et Eric Kalkhoven. « Electric Pulse Stimulation of Myotubes as an In Vitro Exercise Model: Cell-Mediated and Non-Cell-Mediated Effects ». *Scientific Reports* 5 (19 juin 2015): 10944. doi:10.1038/srep10944.

**Gratas-Delamarche**, A., F. Derbré, S. Vincent, et J. Cillard. 2014. « Physical Inactivity, Insulin Resistance, and the Oxidative-Inflammatory Loop ». *Free Radical Research* 48 (1): 93‑108. doi:10.3109/10715762.2013.847528.

**Guéritat**, Jordan. 2015. « Exercice physique et progression du cancer de la prostate : effets combinés avec la prise d'antioxydants naturels ou la radiothérapie externe : identification de voies de signalisation redox-dépendantes ». Rennes 2. http://www.theses.fr/2015REN20012.

**Hartwig**, Sonja, Silja Raschke, Birgit Knebel, Mika Scheler, Martin Irmler, Waltraud Passlack, Stefan Muller, et al. 2014. « Secretome Profiling of Primary Human Skeletal Muscle Cells ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1844 (5): 1011‑17. doi:10.1016/j.bbapap.2013.08.004.

**Henningsen**, Jeanette, Kristoffer T. G. Rigbolt, Blagoy Blagoev, Bente Klarlund Pedersen, et Irina Kratchmarova. 2010. « Dynamics of the Skeletal Muscle Secretome during Myoblast Differentiation ». *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 9 (11): 2482‑96. doi:10.1074/mcp.M110.002113.

**Khan**, Karim M., Angela M. Thompson, Steven N. Blair, James F. Sallis, Kenneth E. Powell, Fiona C. Bull, et Adrian E. Bauman. 2012. « Sport and Exercise as Contributors to the Health of Nations ». *Lancet (London, England)* 380 (9836): 59‑64. doi:10.1016/S0140-6736(12)60865-4.

**Lambernd**, S., A. Taube, A. Schober, B. Platzbecker, S. W. Görgens, R. Schlich, K. Jeruschke, J. Weiss, K. Eckardt, et J. Eckel. « Contractile Activity of Human Skeletal Muscle Cells Prevents Insulin Resistance by Inhibiting pro-Inflammatory Signalling Pathways ». *Diabetologia* 55, nº 4 (avril 2012): 1128‑39. doi:10.1007/s00125-012-2454-z.

**Langelaan**, Marloes L. P., Kristel J. M. Boonen, Kang Yuen Rosaria-Chak, Daisy W. J. van der Schaft, Mark J. Post, et Frank P. T. Baaijens. 2011. « Advanced Maturation by Electrical Stimulation: Differences in Response between C2C12 and Primary Muscle Progenitor Cells ». *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 5 (7): 529‑39. doi:10.1002/term.345.

**Lindner**, J. L., S. Loibl, C. Denkert, B. Ataseven, P. A. Fasching, B. M. Pfitzner, B. Gerber, et al. 2015. « Expression of Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine (SPARC) in Breast Cancer and Response to Neoadjuvant Chemotherapy ». *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 26 (1): 95‑100. doi:10.1093/annonc/mdu487.

**Marotta**, Mario, Ramón Bragós, et Anna M. Gómez-Foix. 2004. « Design and Performance of an Electrical Stimulator for Long-Term Contraction of Cultured Muscle Cells ». *BioTechniques* 36 (1): 68‑73.

**Muñoz-Cánoves**, Pura, Camilla Scheele, Bente K. Pedersen, et Antonio L. Serrano. 2013. « Interleukin-6 Myokine Signaling in Skeletal Muscle: A Double-Edged Sword? » *The FEBS Journal* 280 (17): 4131‑48. doi:10.1111/febs.12338.

**Nikolić**, Nataša, Siril Skaret Bakke, Eili Tranheim Kase, Ida Rudberg, Ingeborg Flo Halle, Arild C. Rustan, G. Hege Thoresen, et Vigdis Aas. « Electrical Pulse Stimulation of Cultured Human Skeletal Muscle Cells as an In Vitro Model of Exercise ». *PLoS ONE* 7, nº 3 (22 mars 2012): e33203. doi:10.1371/journal.pone.0033203.

**Orfanos**, Zacharias, Markus P. O. Gödderz, Ekaterina Soroka, Tobias Gödderz, Anastasia Rumyantseva, Peter F. M. van der Ven, Thomas J. Hawke, et Dieter O. Fürst. 2016. « Breaking Sarcomeres by in Vitro Exercise ». *Scientific Reports* 6: 19614. doi:10.1038/srep19614.

**Ost**, Mario, Verena Coleman, Juliane Kasch, et Susanne Klaus. 2016. « Regulation of Myokine Expression: Role of Exercise and Cellular Stress ». *Free Radical Biology & Medicine*, février. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2016.02.018.

**Ott**, J. J., A. Ullrich, M. Mascarenhas, et G. A. Stevens. 2011. « Global Cancer Incidence and Mortality Caused by Behavior and Infection ». *Journal of Public Health (Oxford, England)* 33 (2): 223‑33. doi:10.1093/pubmed/fdq076.

**Pedersen**, Bente Klarlund, Thorbjörn C. A. Akerström, Anders R. Nielsen, et Christian P. Fischer. 2007. « Role of Myokines in Exercise and Metabolism ». *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 103 (3): 1093‑98. doi:10.1152/japplphysiol.00080.2007.

**Pedersen**, Bente K. 2009. « The Diseasome of Physical Inactivity--and the Role of Myokines in Muscle--Fat Cross Talk ». *The Journal of Physiology* 587 (Pt 23): 5559‑68. doi:10.1113/jphysiol.2009.179515.

**Pedersen**, Bente K., et Mark A. Febbraio. 2012. « Muscles, Exercise and Obesity: Skeletal Muscle as a Secretory Organ ». *Nature Reviews. Endocrinology* 8 (8): 457‑65. doi:10.1038/nrendo.2012.49.

**Pedersen**, Bente K. 2013. « Muscle as a Secretory Organ ». *Comprehensive Physiology* 3 (3): 1337‑62. doi:10.1002/cphy.c120033.

**Qin**, Yi-Xian, et Minyi Hu. 2014. « Mechanotransduction in Musculoskeletal Tissue Regeneration: Effects of Fluid Flow, Loading, and Cellular-Molecular Pathways ». *BioMed Research International* 2014: 863421. doi:10.1155/2014/863421.

**Raschke**, Silja, et Jürgen Eckel. 2013. « Adipo-Myokines: Two Sides of the Same Coin--Mediators of Inflammation and Mediators of Exercise ». *Mediators of Inflammation* 2013: 320724. doi:10.1155/2013/320724.

**Schnyder**, Svenia, et Christoph Handschin. 2015. « Skeletal Muscle as an Endocrine Organ: PGC-1α, Myokines and Exercise ». *Bone* 80 (novembre): 115‑25. doi:10.1016/j.bone.2015.02.008.

**Silveira**, Leonardo R., Henriette Pilegaard, Keiko Kusuhara, Rui Curi, et Ylva Hellsten. « The Contraction Induced Increase in Gene Expression of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR)-Gamma Coactivator 1alpha (PGC-1alpha), Mitochondrial Uncoupling Protein 3 (UCP3) and Hexokinase II (HKII) in Primary Rat Skeletal Muscle Cells Is Dependent on Reactive Oxygen Species ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1763, nº 9 (septembre 2006): 969‑76. doi:10.1016/j.bbamcr.2006.06.010.

**So**, Byunghun, Hee-Jae Kim, Jinsoo Kim, et Wook Song. 2014. « Exercise-induced myokines in health and metabolic diseases ». *Integrative Medicine Research*, Gathering, Connecting, and Integrating, 3 (4): 172‑79. doi:10.1016/j.imr.2014.09.007.

**van der Schaft**, Daisy W. J., Ariane C. C. van Spreeuwel, Kristel J. M. Boonen, Marloes L. P. Langelaan, Carlijn V. C. Bouten, et Frank P. T. Baaijens. « Engineering Skeletal Muscle Tissues from Murine Myoblast Progenitor Cells and Application of Electrical Stimulation ». *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, nº 73 (2013): e4267. doi:10.3791/4267.

**White**, Mary C., Dawn M. Holman, Jennifer E. Boehm, Lucy A. Peipins, Melissa Grossman, et S. Jane Henley. 2014. « Age and Cancer Risk: A Potentially Modifiable Relationship ». *American Journal of Preventive Medicine* 46 (3 Suppl 1): S7‑15. doi:10.1016/j.amepre.2013.10.029.

**Winzer**, Brooke M., David C. Whiteman, Marina M. Reeves, et Jennifer D. Paratz. 2011. « Physical Activity and Cancer Prevention: A Systematic Review of Clinical Trials ». *Cancer Causes & Control: CCC* 22 (6): 811‑26. doi:10.1007/s10552-011-9761-4.

**Xiong**, Gordon Minru, Anh Tuan Do, Jun Kit Wang, Chee Leong Yeoh, Kiat Seng Yeo, et Cleo Choong. 2015. « Development of a miniaturized stimulation device for electrical stimulation of cells ». *Journal of Biological Engineering* 9: 14. doi:10.1186/s13036-015-0012-1.

# Annexes

| Myokine | Gène | Espèce | Référence |
|---|---|---|---|
| **Les Interleukines** | | | |
| **IL-4** | IL4 | - | Brandt et Pedersen 2010 |
| **IL-6** | IL6 | - | Brandt et Pedersen 2010 |
| **IL-7** | IL7 | - | Brandt et Pedersen 2010 |
| **IL-8** | IL8 | - | Brandt et Pedersen 2010 |
| **IL-15** | IL15 | Homme | Ost et al. 2016 |
| | | Rat | Ost et al. 2016 |
| | | Mice | Ost et al. 2016 |
| **Brain-Derived Neurotrophic Factor (Neurotrophin)** | BDNF | Rat | Ost et al. 2016 |
| | | Souris | Ost et al. 2016 |
| | | Souris C2C12 | Ost et al. 2016 |
| | | Homme | Ost et al. 2016 |
| **Leukemia Inhibitory Factor** | LIF | Homme | Ost et al. 2016 |
| | | Souris MDX | Ost et al. 2016 |
| **Irisin** | FNDC5 | Souris | Ost et al. 2016 |
| | | Homme | Ost et al. 2016 |
| **Les "Fibroblasts Growth Factors" / Facteurs de croissance de fibroblastes** | | | |
| **Fibroblast Growth Factor 2 (Basic)** | FGF2 | - | Brandt et Pedersen 2010 |
| **Fibroblast Growth Factor 21** | FGF21 | Human | Ost et al. 2016 |
| | | Mice | Ost et al. 2016 |
| **Secreted Protein, Acidic and Rich in Cystein (Osteonectin)** | SPARC | Human | So et al. 2014 |
| | | Mouse | |
| **Insulin-like growth factor 1 (Somatomedin C)** | IGF1 | - | Ost et al. 2016 |
| **Les "Growth / Differenciation Factors"** | | | |
| **GDF-8** (Myostatine) | MSTN | - | Ost et al. 2016 |
| **GDF-15** | GDF15 | - | Ost et al. 2016 |
| **Myonectine** | CTRP15 | - | Ost et al. 2016 |
| **Follistatin-Like Protein 1 (FSL1)** | FSTL1 | - | Brandt et Pedersen 2010 |
| **Meteorin, Glial Cell Differentiation Regulator-Like (Subfatin)** | METRNL | - | Brandt et Pedersen 2010 |
| **Chemokine (C-X-C Motif) Ligand 1** | CXCL1 | - | Brandt et Pedersen 2010 |
| **Transforming Growth Factor, Beta 1 (TGF-β)** | TGFB | - | Brandt et Pedersen 2010 |
| **Ciliary Neurotrophic Factor** | CNTF | - | Schnyder et Handschin 2015 |
| **Oncostatin M** | OSM | - | Schnyder et Handschin 2015 |
| **Chemokine (C-C Motif) Ligand 2 (MCP-1)** | CCL2 | - | Raschke et Eckel 2013 |
| **Angiopoietin-Like 4** | ANGPTL4 | - | Raschke et Eckel 2013 |
| **Vascular Endothelial Growth Factor** | VEGF | - | Ost et al. 2016 |
| **Regulator of Calcineurin 1 (RCAN-1)** | RCAN1 | - | Emrani et al. 2015 |
| **Apeline** | APLN | - | Ost et al. 2016 |
| **Chitinase 3-Like 1 (Cartilage Glycoprotein-39)** | CHI3L1 | - | Ost et al. 2016 |
| **Ostéocrine** (Muscline / Musculine) | OSTN | - | Ost et al. 2016 |
| **Vitronectine** | VTN | - | Hartwig et al. 2014 |
| **Ephrin type-A receptor 4** | EPHA4 | - | Hartwig et al. 2014 |
| **Granulocyte colony stimulating factor 3** | CSF3 | - | Hartwig et al. 2014 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| **Retinoic acid receptor responder protein 1** | RARRES1 | - | **Hartwig et al. 2014** |
| **Beta-mannosidase** | MANBA | - | **Hartwig et al. 2014** |
| **Collagen triple helix repeat-containing protein 1** | CTHRC1 | - | **Hartwig et al. 2014** |
| **Cartilage oligomeric matrix protein** | COMP | - | **Hartwig et al. 2014** |
| **Plasminogen activator urokinase** | PLAU | - | **Hartwig et al. 2014** |
| **PAI-1 (Serpin E1)** | SERPINE1 | - | **Raschke et Eckel 2013** |
| **PEDF (Serpin F1)** | SERPINF1 | - | **Raschke et Eckel 2013** |
| **Dipeptidyl peptidase-4** | DPP4 | - | **Raschke et Eckel 2013** |
| **Secreted frizzled-related protein 4** | SFRP4 | - | **Hartwig et al. 2014** |
| **Integrin beta-like protein 1** | ITGBL1 | - | **Hartwig et al. 2014** |
| **Latent transforming growth factor beta binding protein 2** | LTBP2 | - | **Hartwig et al. 2014** |
| **Sushi repeat containing protein X-linked** | SRPX | - | **Hartwig et al. 2014** |
| **Protéoglycanes qui fonctionnent comme des myokines** | | | |
| **Décorine** | DCN | | **Ost et al. 2016** |
| **Produit du métabolisme** | | | |
| **Acide β-aminoisobutyrique (BAIBA)** | Pas une protéine | - | **Schnyder et Handschin 2015** |

**Tableau I: Les différentes myokines actuellement connues**

| Lignée de myocytes | | Publication | Milieu de Croissance (GM = Growth Medium) | Durée (jour) |
|---|---|---|---|---|
| Souris | C2C12 (CRL-1772) | **Burch et al. 2010** | DMEM supplémenté avec de la P/S (1% ; 10 µg/ml) et du FBS (FBS ; 10% ; 100µg/ml) | Jusqu'à ce que les cellules atteignent 90% de confluence |
| | | **Gogh et al. 2015** | DMEM contenant 4.5 g/l de glucose (Lonza, Basel, Switzerland) supplémenté avec du sérum foetal bovin inactivé par la chaleur (FBS ; 10% ; 100µg/ml ; Gibco/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), de la pénicilline (10% ; 100µg/ml ; Lonza) et de la streptomycine (10%; 100µg/ml ; Lonza) | Jusqu'à ce que les cellules atteignent 80-90% de confluence |
| | | **van der Schaft et al. 2013** | DMEM avancé (335 ml), supplémenté avec du sérum foetal bovin (FBS ; 20% ; 100 ml), du sérum de cheval (HS ; 10 %; 50 ml), de la pénicilline (1% ; 5 ml), de la streptomycine (1 % ; 5 ml), de la L-glutamine (1% ; 5 ml) et de l'extrait d'embryon de poulet (CEE ; 1% ; 5 ml).<br>Les cellules sont repiquées (1:3) tous les 3 jours. | 12 |
| | | **Orfanos et al. 2016** | Dans un milieu DMEM riche en glucose, avec du GlutaMax (Thermo Fischer Scientific Gibco, Darmstadt, Germany) et contenant du FCS (15% ; 150µg/ml), des acides aminés non essentiels (2mM), du pyruvate de sodium (1mM), de la pénicilline (100U/ml) et de la streptomycine (100µg/ml).<br>Le milieu est changé tous les 2 jours. | - |
| | SOL8 (CRL-2174) | **Burch et al. 2010** | DMEM supplémenté avec de la pénicilline (1% ; 10 µg/ml), de la streptomycine (1% ; 10 µg/ml) et du sérum foetal bovin (FBS ; 20% ; 200µg/ml). | Jusqu'à ce que les cellules atteignent 90% de confluence |
| Rat | Wistar Cellules primaires de MSS des membres postérieurs (Mâle ; 150g) | **Silveira et al. 2006** | DMEM supplémenté avec du FCS (20% ; 200µg/ml) | 2 |
| Humaine | | **Nikolić et al. 2012** | DMEM-Glutamax™ supplémenté avec du sérum de veau foetal (FCS ; 2% ; 20µg/ml), de l'Ultroser G (2% ; 20µg/ml), de la pénicilline (50 U/ml), de la streptomycine (50 mg/ml) et de l'amphotéricine B (1,25 mg/ml).<br>Pas d'insuline ajoutée<br>Culture à 80% de confluence | 7 à 14 |
| | | **Lambernd et al. 2012** | Milieu modifié α de Eagle (αMEM) ou milieu Ham's F-12 | Jusqu'à ce que les cellules aient presque atteint la confluence |

**Tableau II: Comparaison des temps et des milieux de croissance entre les différents protocoles évoqués dans la revue de littérature**

| Lignée de myocytes | | Publication | Milieu de différenciation (DM Differenciation medium) | Durée (jour) |
|---|---|---|---|---|
| Souris | C2C12 (CRL-1772) | **Burch et al. 2010** | DMEM supplémenté avec de la P/S (1% ; 10µg/ml) et du HS (2% ; 20µg/ml).<br>Milieu changé toutes les 24 h. | 4 à 6 |
| | | **Gogh et al. 2015** | DMEM contenant 4.5 g/l de glucose (Lonza, Basel, Switzerland) supplémenté de HS (2% ; 20µg/ml ; Gibco/Life Technologies) et de P/S (10% ; 100µg/ml).<br>Milieu changé toutes les 24 h. | 5 |
| | | **van der Schaft et al. 2013** | Milieu de différenciation = Milieu de croissance utilisé dans le tableau précédent, sans CEE.<br>DMEM avancé (335 ml), supplémenté avec du sérum foetal bovin (FBS ; 20% ; 100 ml), du sérum de cheval (HS ; 10%; 50 ml), de la pénicilline (1% ; 5 ml), de la streptomycine (1% ; 5 ml), de la L-glutamine (1% ; 5 ml)<br>Milieu renouvelé tous les 2-3 jours. | 7 |
| | | **Orfanos et al. 2016** | Dans un milieu DMEM riche en glucose, avec du GlutaMax (Thermo Fischer Scientific Gibco, Darmstadt, Germany), du HS (2% ; 20µg/ml), des acides aminés non-essentiels (2mM), du pyruvate de sodium (1mM), de la pénicilline (100U/ml) et de la streptomycine (100µg/ml).<br>Le milieu est changé tous les 2 jours. | - |
| | SOL8 (CRL-2174) | **Burch et al. 2010** | DMEM supplémenté avec de la P/S (1% ; 10µg/ml), et du HS (2% ; 20µg/ml).<br>Milieu changé toutes les 24 h. | 4 à 6 |
| Rat | Wistar Cellules primaires de MSS des membres postérieurs (Mâle ; 150g) | **Silveira et al. 2006** | DMEM supplémenté avec du HS (10% ; 100µg/ml).<br><br>Rq: Le terme “Milieu de fusion (MF)” désigne le milieu de différenciation | 1 |
| Humaine | | **Nikolić et al. 2012** | DMEM-Glutamax™ complémenté avec du FCS (2% ; 20µg/ml), de la pénicilline (50 U/ml), de la streptomycine (50 mg/ml) et de l’amphotéricine B (1,25 mg/ml).<br>25 pM d’insuline sont ajoutés<br>Le milieu est changé tous les 2 à 3 jours. | 8 à 9 |
| | | **Lambernd et al. 2012** | αMEM contenant du HS (2% ; 20µg/ml). | 5 |

**Tableau III: Comparaison des temps et des milieux de différenciation entre les différents protocoles évoqués dans la revue de littérature**

| Programmes de stimulation appliqués sur des **lignées animales** de myocytes (partie 1) | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Publication | **Burch et al. 2010** | | | **Gogh et al. 2015** |
| Myocytes utilisés | Myocytes murins C2C12 (CRL-1772) et SOL8 (CRL-2174) | | | C2C12 (murin) |
| Etat de différenciation des myocytes | Utilisés après 4 à 6 jours dans un milieu de différenciation (DMEM, 1% de P/S (10µg/ml), 2% de HS). Milieu changé toutes les 24 h | | | Utilisés après 5 jours dans un milieu de différenciation ( DMEM, 4,5 g/l de glucose, 2% de HS (Gibco/Life Technologies), 10% de P/S (100µg/ml). Milieu changé toutes les 24 h. |
| Appareil de stimulation | C-Pace EP culture pacer (IonOptix,Dublin, Ireland) | | | (C-Pace 100; IonOptix, Milton, MA, USA) |
| Type de plaque de culture | 6 well plates (Corning, New York, USA) | | | - |
| Nombre de cellules ensemencées par puits | - | | | - |
| Type d'exercice imité | Aigu | Intermittent | Continu | Continu |
| Durée totale de la session de stimulations (EPS) (min ou h) | 1x90 min | plusieurs fois90 min à intervalle régulier durant 4 jours | 24 h | 24 h |
| Changement du milieu de culture | 1 h avant chaque session de stimulations | | | - |
| Temps de récupération (ms) (Durée de pause entre 2 stimulations) | 1000 | | | 0 |
| Durée de la stimulation (trains) (ms) | 1000 | | | 2 |
| Type de stimulation | Train (suite) d'impulsions | | | - |
| Impulsion (pulse) | Bipolaire | | | - |
| Durée d'impulsion (ms) | 1 | | | 2 |
| Voltage (V) | 14 | | | 11,5 |
| Fréquence (Hz) | 50 | | | 1 |
| Intervalle entre 2 impulsions (pulses ; ms) | 20 | | | 1000<br>(1 Hz = 1 événement par s) |

**Tableau IV: Comparaison des paramètres EPS utilisés entre les différents protocoles évoqués dans la revue de littérature (1)**

| Programmes de stimulation appliqués sur des **lignées animales** de myocytes (partie 2) | | |
|---|---|---|
| Publication | **van der Schaft et al. 2013** | **Silveira et al. 2006** |
| Myocytes utilisés | C2C12 (murin) | Cellules primaires de MSS des membres postérieurs de rats mâles Wistar (150g) - Sacrifice par dislocation cervicale Culture dans un premier milieu de croissance (DMEM; 20% de FCS) durant 48 h. Puis dans un milieu de différenciation appelé “milieu de fusion” (MF) (DMEM; 10% de HS) durant 24 h. |
| Etat de différenciation des myocytes | Myocytes différenciés tous alignés en myotubes, dans le Matrigel, perpendiculairement aux électrodes | Les myocytes commencent à se différencier et à former des myotubes plurinucléés 72 h après la mise en culture. (vérification de l’activité contractile par examen au microscope) |
| Appareil de stimulation | C-Pace EP culture pacer (IonOptix,Dublin, Ireland) | Stimulateur de culture équipé d’électrodes en platine |
| Type de plaque de culture | 6 well plates (C-Dish, IonOptix) | 30mm dishes |
| Nombre de cellules ensemencées | entre $7,5x10^5$ et $12,5x10^5$ cellules par construction en Collagen/Matrigel | - |
| Type d’exercice imité | - | Aigu |
| Durée totale de la session de stimulations (EPS) (min ou h) | - | 90 min |
| Changement du milieu de culture | Tous les 24 h durant les stimulations | - |
| Temps de récupération (ms) (Durée de pause entre 2 stimulations) | - | 500 ms pauses |
| Durée de la stimulation (ms) (trains) | continue | 500 |
| Type de stimulation | - | - |
| Impulsion (pulse) | - | - |
| Durée d’impulsion (ms) | 6 | 1 |
| Voltage (V) | 4 (“4V/CM”) | 10 |
| Fréquence (Hz) | 2 | 50 |
| Intervalle entre 2 impulsions (pulses ; ms) | 500 | 20 |

**Tableau V: Comparaison des paramètres EPS utilisés entre les différent protocoles évoqués dans la revue de littérature (2)**

| Programmes de stimulation appliqués sur des **lignées animales** de myocytes (partie 3) | | |
|---|---|---|
| Publication | **Orfanos et al. 2016** | |
| Myocytes utilisés | C2C12 (murin) | |
| Etat de différenciation des myocytes | Myocytes différenciés dans un milieu DMEM riche en glucose, avec du GlutaMax (Thermo Fischer Scientific Gibco, Darmstadt, Germany), du HS (2% ; 20µg/ml), des acides aminés non-essentiels (2mM), du pyruvate de sodium (1mM), de la pénicilline (100U/ml) et de la streptomycine (100µg/ml).<br>Temps de différenciation non précisé. | |
| Appareil de stimulation | C-Pace unit (Ion Optix, Milton, MA, USA) | |
| Type de plaque de culture | Lamelles de 15 mm lavées à l'éthanol, autoclavées puis placées dans une plaque 6 puits (CytoOne/Starlab, Hamburg, Germany) | |
| Nombre de cellules ensemencées | - | |
| Type d'exercice imité | - | |
| Durée totale de la session de stimulations (EPS) (min ou h) | - | |
| Changement du milieu de culture | - | |
| Temps de récupération (ms)<br>(Durée de pause entre 2 stimulations) | - | 5 secondes |
| Durée de la stimulation (ms)<br>(trains) | - | |
| Type de stimulation | - | |
| Impulsion (pulse) | Un seul pulse par seconde | Alternance entre des impulsions en continu pendant 5 secondes à 15 Hz, 5 secondes de pause, des impulsions pendant 5 secondes à 5 Hz, puis de nouveau 5 secondes de pause. |
| Durée d'impulsion (ms) | 20 | |
| Voltage (V) | 10 | |
| Fréquence (Hz) | Protocole "twitch":<br>1 | Protocole "damage":<br>15 et 5 |
| Intervalle entre 2 impulsions (pulses ; ms) | - | - |

**Tableau VI: Comparaison des paramètres EPS utilisés entre les différent protocoles évoqués dans la revue de littérature (3)**

| Programmes de stimulation appliqués sur des **lignées humaines** de myocytes (partie 1) | | |
|---|---|---|
| Publication | **Nikolić et al. 2012** | |
| Myocytes utilisés | Myocytes humains et issus d'une banque de cellules satellites constituée à partir d'échantillons de biopsies de muscles obliques internes de l'abdomen prélevés sur des volontaires en bonne santé. 12 femmes, 2 hommes ; entre 34 et 70 ans, moy= 50,9 +/- 9 ans ; Un IMC entre 19,6 et 29,7 kg/m², moy= 23,9 +/- 0,9 kg/m². La glycémie à jeun de ces volontaires est comprise entre 4,9 et 6,9 mM, moy= 5,2 +/- 0,2 mM. Les taux de lipides plasmatiques et les pressions sanguines des volontaires sont dans la normale. | |
| Etat de différenciation des myocytes | 1 à 2 semaines, à 80% de confluence, dans un milieu de croissance (DMEM-Glutamax™, 2% de FCS, 2% d'Ultroser G, 50 U/ml de pénicilline, 50 mg/ml de streptomycine, 1,25 mg/ml d'amphotéricine B, sans insuline ajoutée). Puis, le milieu de croissance est remplacé par un milieu de différenciation (DMEM-Glutamax™, 2% de FCS, 50 U/ml de pénicilline, 50 mg/ml de streptomycine, 1,25 mg/ml d'amphotéricine B, 25 pM d'insuline) pendant 8 à 9 jours. Le milieu est changé tous les 2 à 3 jours. | |
| Appareil de stimulation | Un électrostimulateur fabriqué dans un laboratoire d'électronique de l'Institut de Chimie de l'Université d'Oslo | |
| Type de boite de culture (C-Dish) | Boite de culture 6 puits recouverts d'un gel matrice mimant la MEC | |
| Nombre de cellules ensemencées | Tous les myotubes cultivés sont utilisés | |
| Type d'exercice imité | Chronique | Aigu |
| Durée totale de la session de stimulations (EPS) (min ou h) | 24-48h<br>Durant la fin de la période de différenciation | 5-60 min |
| Changement du milieu de culture | Toutes les 12 h | Non |
| Temps de récupération (ms) (Durée de pause entre 2 stimulations) | 0<br>(stimulation continue) | 5000 ("a pulse every 5th second") |
| Durée de la stimulation (trains) (ms) | 2 | 200 |
| Type de stimulation (pulse) | Impulsion unique | Train (suite) d'impulsions |
| Impulsion | Bipolaire | |
| Durée d'impulsion (ms) | 2 | |
| Voltage (V) | 30 | |
| Fréquence (Hz) | 1 | 100 |
| Intervalle entre 2 impulsions (pulses : ms) | 1000 | 10 |

**Tableau VII: Comparaison des paramètres EPS utilisés entre les différents protocoles évoqués dans la revue de littérature (4)**

| Programmes de stimulation appliqués sur des **lignées humaines** de myocytes (partie 2) | |
|---|---|
| Publication | **Lambernd et al. 2012** |
| Myocytes utilisés | Cellules de muscle squelettique humain (HSkMC) provenant de 5 donneurs en bonne santé. 3 hommes âgés respectivement de 16, 21 et 47 ans, ainsi que 2 femmes, âgées respectivement de 33 et 37 ans. |
| Etat de différenciation des myocytes | Myotubes complètement différenciés après 5 jours dans un milieu α-modified Eagle's medium (αMEM) complémenté avec du HS suivi d'une nuit dans du αMEM sans sérum. |
| Appareil de stimulation | C-Pace 100; IonOptix, Milton, MA, USA. Electrodes en carbone |
| Type de boite de culture (C-Dish) | Boîte de culture 6 puits (C-Dish) |
| Nombre de cellules ensemencées | Les cellules sont ensemencées à raison de $1x10^5$ cellules par puits |
| Type d'exercice imité | - |
| Durée totale de la session de stimulations (EPS) (min ou h) | De 2 à 24 h |
| Changement du milieu de culture | Juste avant le début de la stimulation |
| Temps de récupération (ms) (Durée de pause entre 2 stimulations) | - |
| Durée de la stimulation (ms) (trains) | - |
| Type de stimulation | - |
| Impulsion (pulse) | Bipolaire |
| Durée d'impulsion (ms) | 2 |
| Voltage (V) | 11,5 |
| Fréquence (Hz) | 1 |
| Intervalle entre 2 impulsions (pulses ; ms) | - |

**Tableau VIII: Comparaison des paramètres EPS utilisés entre les différent protocoles évoqués dans la revue de littérature (5)**

| | Fibres à contraction Lente | Fibres à contraction rapide | | |
|---|---|---|---|---|
| | Oxydatives | | Glycolytiques | |
| | Type 1 | Type 2 a | Type 2 x | Type 2 b |
| | “Slow twich” | “Fast twich a” | “Fast twich x” | “Fast twich b” |
| | ST | FTa | FTx | FTb |
| Coloration | Rouges | Roses | | Blanches |
| Temps de contraction | Lentes oxydatives | Rapides Intermédiaires | Rapides | Très rapides |
| Résistance à la fatigue | Elevée | Assez élevée | Modérée | Faible |
| Type de métabolisme le plus efficace | Métabolisme **aérobie** | | Métabolisme **anaérobie** | |
| | Long terme | Long terme | Court terme | Court terme |
| Temps maximum de recrutement | Plusieurs heures | Moins de 30 minutes | Moins de 5 minutes | Moins de 1 minute |
| Densité mitochondriale | Très forte | Forte | Modérée | Faible |
| Capacités oxydatives | Élevées | Élevées | Modérées | Faibles |
| Vascularisation | Dense | Intermédiaire | Faible | Faible |
| Substrats énergétiques les plus stockés | Triglycérides | PCr Glycogène | ATP PCr Glycogène en faible quantité | ATP PCr |
| Propriétés particulières | Consommation d’acide lactique | Production d’acide lactique et de PCr | Consommation de PCr | Consommation de PCr |
| Isoforme de MyHC caractéristique | MyHC-β/lent | MyHC-IIa | MyHC-IIx/d | MyHC-IIb |
| Gène associé | MYH7 | MYH2 | MYH1 | MYH4 |

**Tableau IX: Les différents types de fibres des MSS**

# ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné(e) Joaquim Grimaud
déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiée sur toutes formes de support, y compris l'internet, constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée.
En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire ce rapport ou mémoire.

signé par l'étudiant(e) le **08** / **05** / **2016**

