2015-2016

Master1

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)

Contexte général

Les **cancers**, 2ème cause de mortalité dans le monde

(22% des décès par maladies non transmissibles ; OMS, 2012)

(White et al. 2014)

Contexte général

Les **cancers**, 2ème cause de mortalité dans le monde

(22% des décès par maladies non transmissibles ; OMS, 2012)

(White et al. 2014)

L'Activité physique (AP) améliore la prévention secondaire et tertiaire des cancers

Amélioration de la condition physique globale
⇨ Diminution des effets secondaires indésirables des traitements
⇨ Baisse du risque de mortalité

AP Après diagnostic ou opération:

Risque de mortalité inférieur pour les cancers colorectaux, de la prostate et des poumons

Diminution du risque de récidive des cancers du sein (Courneya et Friedenreich 2011)



Contexte général

Les **cancers**, 2ème cause de mortalité dans le monde

(22% des décès par maladies non transmissibles ; OMS, 2012)

(White et al. 2014)

L'Activité physique (AP) améliore la prévention secondaire et tertiaire des cancers

Amélioration de la condition physique globale
⇨ Diminution des effets secondaires indésirables des traitements
⇨ Baisse du risque de mortalité

AP Après diagnostic ou opération:

Risque de mortalité inférieur pour les cancers colorectaux, de la prostate et des poumons

Diminution du risque de récidive des cancers du sein (Courneya et Friedenreich 2011)



Type d'AP le plus souvent conseillé:
Chronique d'intensité modérée (Ex: Course d'endurance)

Fréquences d'AP	
Aiguë	**Chronique**

Intensités d'AP		
Faible	**Modérée**	Intense

Effets de l'AP sur les mécanismes moléculaires liés à la progression tumorale

AP chronique d'intensité modérée

↘ Insuline et insulino-résistance

↘ Masse grasse et adipokines

↗ Adaptation au stress oxydant

Systémique

Modulation de différents mécanismes qui permet de ralentir la prolifération tumorale

Importance de l'étude des voies de signalisation impliquées dans ces processus

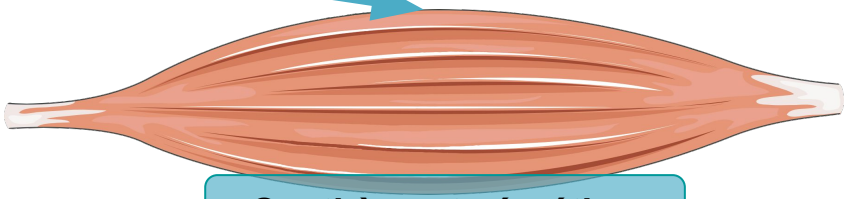
Effets de l'AP sur les mécanismes moléculaires liés à la progression tumorale

AP chronique d'intensité modérée

↘ Insuline et insulino-résistance

↘ Masse grasse et adipokines

↗ Adaptation au stress oxydant



Synthèse et sécrétion

IL-6 **SPARC** **OSM**

Myokines

Systémique

Modulation de différents mécanismes qui permet de ralentir la prolifération tumorale

Importance de l'étude des voies de signalisation impliquées dans ces processus

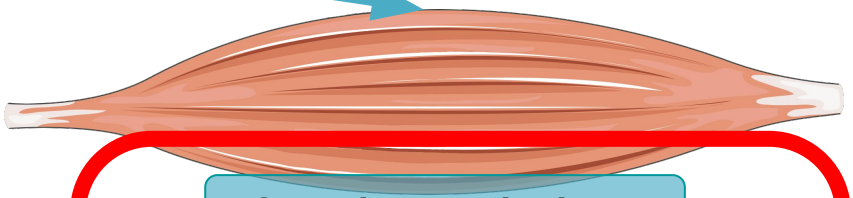
Effets de l'AP sur les mécanismes moléculaires liés à la progression tumorale

AP chronique d'intensité modérée

↘ Insuline et insulino-résistance

↘ Masse grasse et adipokines

↗ Adaptation au stress oxydant



Synthèse et sécrétion

IL-6 | SPARC | OSM

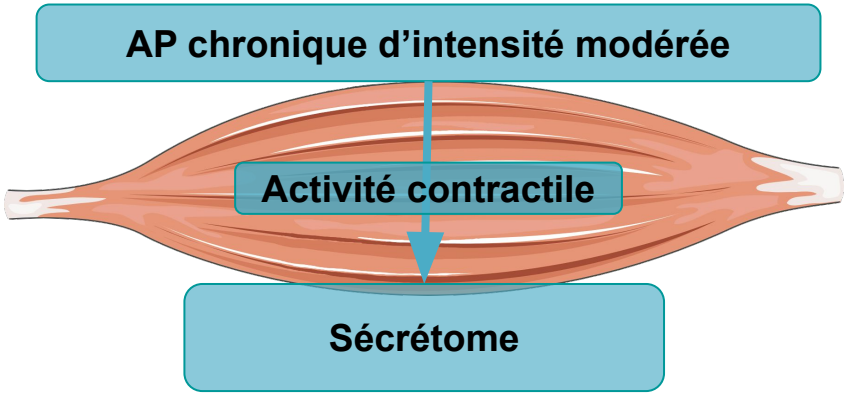
Myokines

Systémique

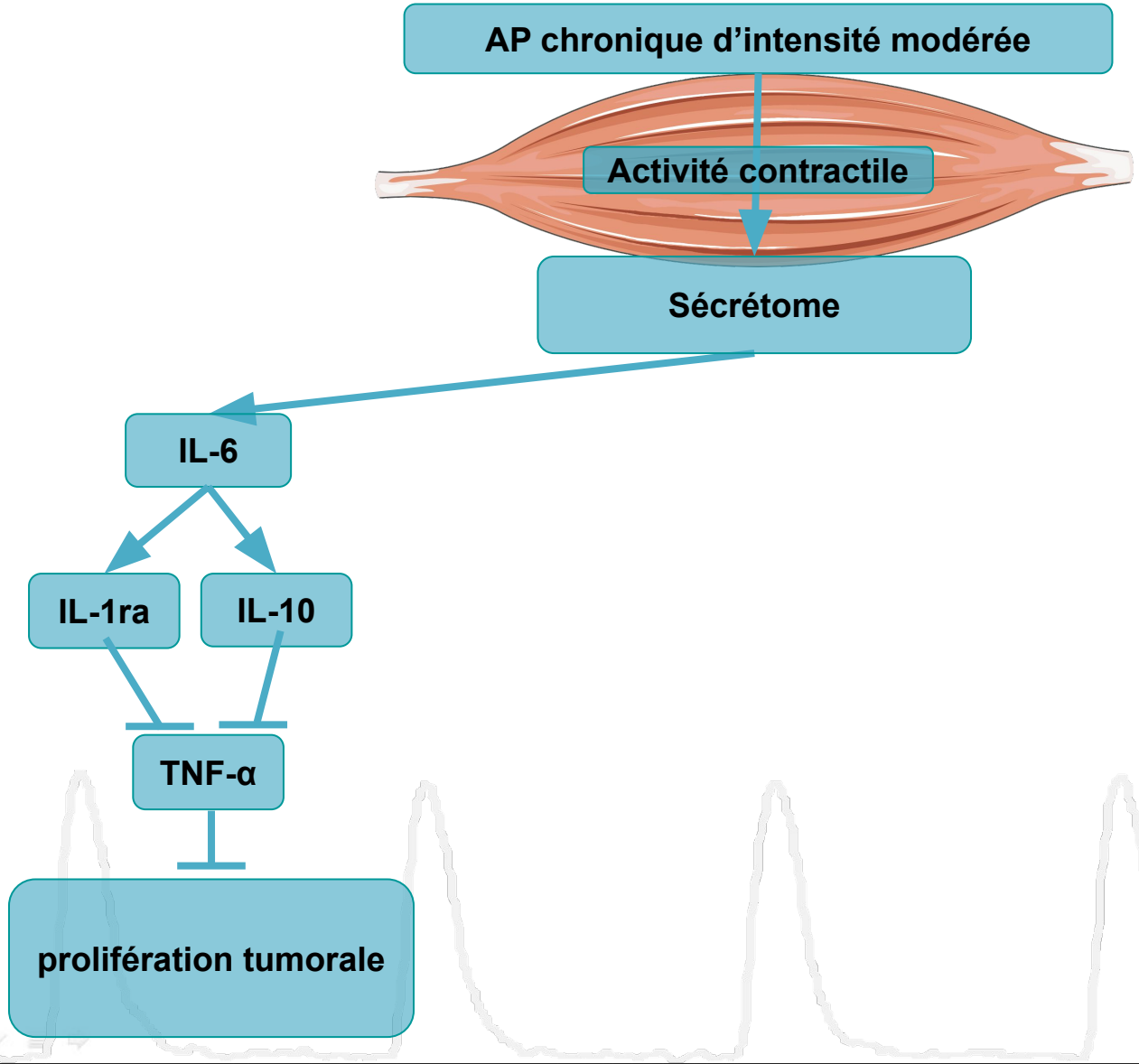
Modulation de différents mécanismes qui permet de ralentir la prolifération tumorale

Importance de l'étude des voies de signalisation impliquées dans ces processus

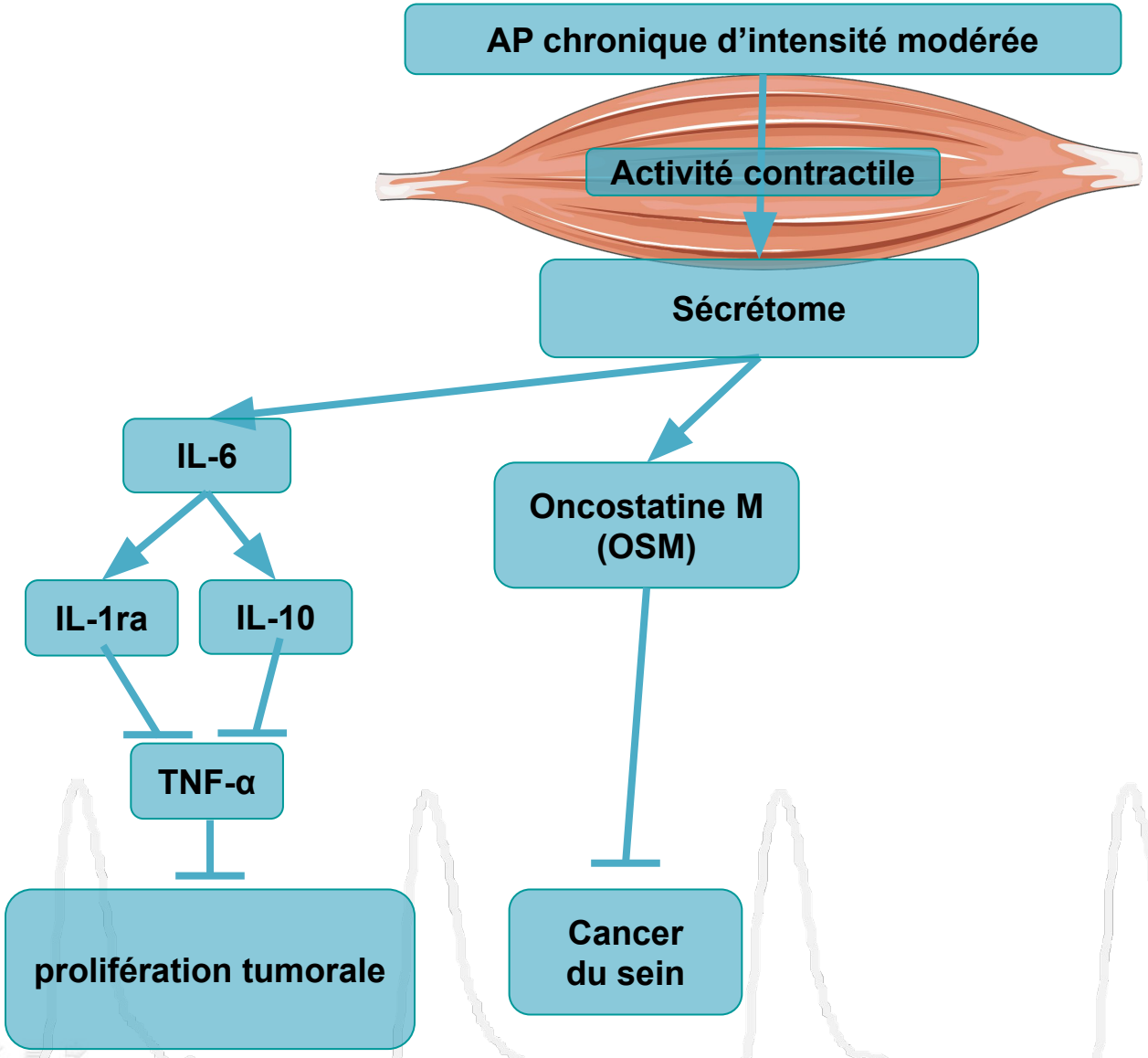
Effets de l'AP sur les mécanismes moléculaires liés à la progression tumorale



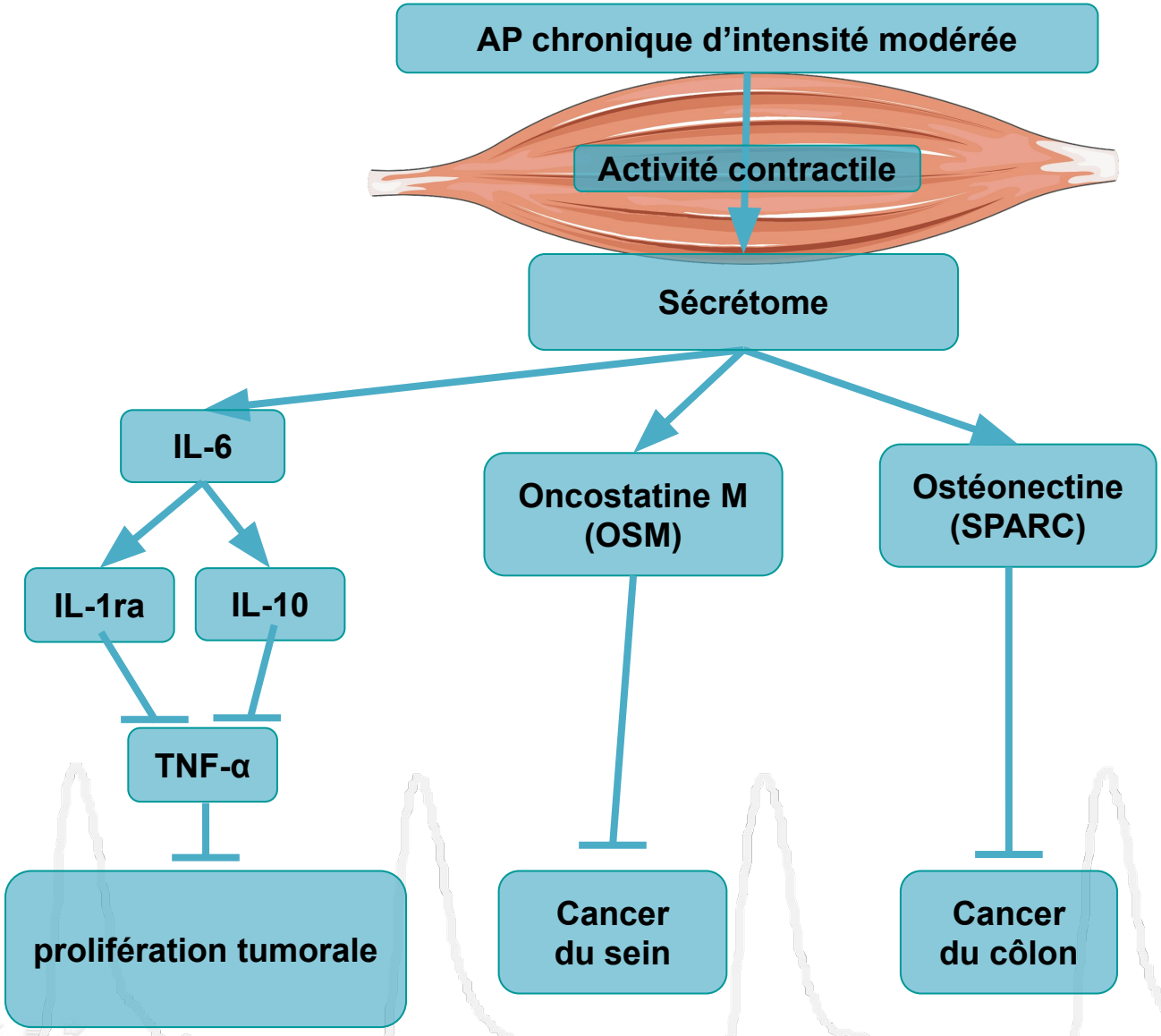
Effets de l'AP sur les mécanismes moléculaires liés à la progression tumorale



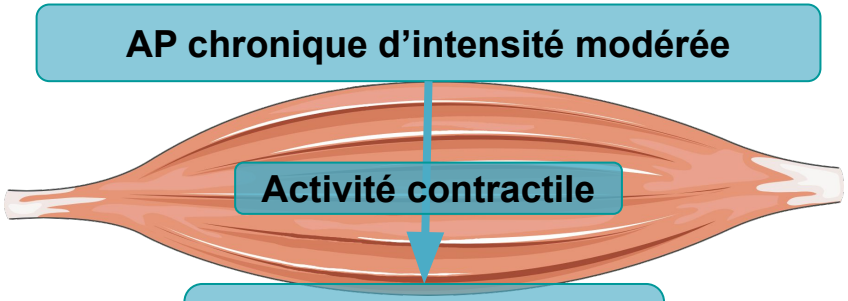
Effets de l'AP sur les mécanismes moléculaires liés à la progression tumorale



Effets de l'AP sur les mécanismes moléculaires liés à la progression tumorale



Effets de l'AP sur les mécanismes moléculaires liés à la progression tumorale



AP chronique d'intensité modérée

Activité contractile

Sécrétome

IL-6

IL-1ra

IL-10

TNF-α

prolifération tumorale

Oncostatine M (OSM)

Cancer du sein

Ostéonectine (SPARC)

Cancer du côlon

Chitinase 3-like 1 CHI3L1

EMT

Migration tumorale

(Ost et al. 2016)

Modèles d'étude de ces mécanismes

In vivo



AP chez des rongeurs porteurs de tumeurs

Utilisation d'actimètres:

- Sur **roue instrumentée**
- Sur **tapis roulant motorisé**

Nage forcée

Electrostimulation d'un muscle squelettique

Modèles d'étude de ces mécanismes

In vivo



AP chez des rongeurs porteurs de tumeurs

Utilisation d'actimètres:

- Sur **roue instrumentée**
- Sur **tapis roulant motorisé**

Nage forcée

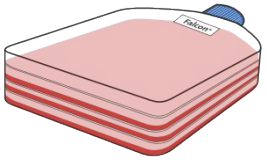
Electrostimulation d'un muscle squelettique

Limites de ces modèles:

On ne sait pas si les effets de l'AP sur la croissance des tumeurs sont liés ou non au sécrétome du muscle

Modèles d'étude de ces mécanismes

In vitro

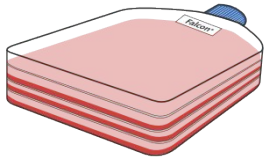


Principe: **Mimer l'AP sur des cellules ou des tissus en culture**

Principal intérêt:
Permet l'isolement et l'étude du sécrétome d'un seul organe ou type de cellule

Modèles d'étude de ces mécanismes

In vitro



Principe: **Mimer l'AP sur des cellules ou des tissus en culture**

Principal intérêt:
Permet l'isolement et l'étude du sécrétome d'un seul organe ou type de cellule

Différents types de stimulations sont possibles:

Stimulation chimique:
- Traitement chronique avec un analogue de l'AMP (**AICAR**)

Stimulation mécanique / mécanotransduction

Stimulation électrique:
- Electrostimulation in vitro = méthode **EPS** "Electrical Pulse Stimulation"

Effets de l'AP chronique d'intensité modérée

Augmentation des **marqueurs** suivants:

- Interleukine 6 (**IL-6**)
- **P**hospho-**AMPK** (Thr172)
- **PGC-1α**
- Enzymes mitochondriales
  Ex: citrate synthase (**CS**)

} Biogenèse mitochondriale



- Isoformes de la chaîne lourde de myosine **MyHCβ** et **MyHC2a**

	Fibres à contraction Lente	Fibres à contraction rapide		
	Oxydatives		Glycolytiques	
	ST	FTa	FTx	FTb
Isoforme de MyHC caractéristique	**MyHC-β/Ient**	**MyHC-IIa**	MyHC-IIx/d	MyHC-IIb
Gène associé	MYH7	MYH2	MYH1	MYH4

Effets de l'AP chronique d'intensité modérée

Augmentation des **marqueurs** suivants:

- Interleukine 6 (**IL-6**)
- **P**hospho-**AMPK** (Thr172)
- **PGC-1α**
- Enzymes mitochondriales
  Ex: citrate synthase (**CS**)

} Biogenèse mitochondriale



- Isoformes de la chaîne lourde de myosine **MyHCβ** et **MyHC2a**

Si **expression augmentée** de ces marqueurs

⇓

Alors, **validation** du protocole de stimulation

	Fibres à contraction Lente	Fibres à contraction rapide		
	Oxydatives		Glycolytiques	
	ST	FTa	FTx	FTb
Isoforme de MyHC caractéristique	**MyHC-β/Ient**	**MyHC-IIa**	MyHC-IIx/d	MyHC-IIb
Gène associé	MYH7	MYH2	MYH1	MYH4

Programmes EPS chroniques dans la littérature

	Chronique et haute fréquence	
	Intermittente	**Continue**
Durée EPS	plusieurs fois **90 min** à intervalle régulier durant 4 jours	**24 h**

-Myotubes: C2C12
-Voltage: **14 V**
-Fréquence: **50 Hz**
-Durée d'impulsion: **1 ms**
-Durée d'un train d'impulsions: 1 sec
-Temps de récupération après chaque stimulation (1 sec)

Expression de **PGC-1α** plus forte pour une stimulation **chronique en continu** par rapport à une stimulation chronique intermittente

(Burch et al. 2010)

⇨ Plutôt s'orienter vers une **stimulation chronique en continu**

Programmes EPS chroniques dans la littérature

	Chronique et haute fréquence	
	Intermittente	**Continue**
Durée EPS	plusieurs fois **90 min** à intervalle régulier durant 4 jours	**24 h**

-Myotubes: C2C12
-Voltage: **14 V**
-Fréquence: **50 Hz**
-Durée d'impulsion: **1 ms**
-Durée d'un train d'impulsions: 1 sec
-Temps de récupération après chaque stimulation (1 sec)

Expression de **PGC-1α** plus forte pour une stimulation **chronique en continu** par rapport à une stimulation chronique intermittente

(Burch et al. 2010)

⇨ Plutôt s'orienter vers une **stimulation chronique en continu**

	Chronique et basse fréquence
Myotubes utilisés	Homme
Durée totale de la session de stimulations	**24** ou **48h**
Durée d'impulsion	**2 ms**
Voltage	**30 V**
Fréquence	**1 Hz**
Effets sur le métabolisme	Augmentation du métabolisme oxydatif
Changements cellulaires observés	Biogenèse mitochondriale
Variations de différents marqueurs	oxydation du glucose et des acides gras ↗
	PDK4 ↗ IL-6 ↗ Cyt c ↗ CPT1b ↗

Augmentation de l'expression des gènes des protéines impliquées dans la **phosphorylation oxydative** et la **biogenèse mitochondriale**

(Burch et al. 2010 ; Nikolić et al. 2012)

⇨ Les paramètres de ces protocoles semblent bien mimer l'AP chronique

Programmes EPS chroniques dans la littérature (2)

Impact de la fréquence

Chronique basse et haute fréquence		
Myocytes utilisés	C2C12	
Durée d'impulsion	20 ms	
Voltage	10 V	
Fréquence	**1 Hz**	**15 et 5 Hz**
Temps de récupération	Aucun	5 secondes

Apparition de **lésions** sur les sarcomères pour des fréquences **trop élevées** sur une durée trop longue

(Orfanos et al. 2016)

⇨ Utiliser une fréquence **entre 1 et 2 Hz** pour une stimulation chronique continue de basse intensité

Programmes EPS chroniques dans la littérature (2)

Impact de la fréquence

Chronique basse et haute fréquence		
Myocytes utilisés	C2C12	
Durée d'impulsion	20 ms	
Voltage	10 V	
Fréquence	**1 Hz**	**15 et 5 Hz**
Temps de récupération	Aucun	5 secondes

Apparition de **lésions** sur les sarcomères pour des fréquences **trop élevées** sur une durée trop longue

(Orfanos et al. 2016)

⇨ Utiliser une fréquence **entre 1 et 2 Hz** pour une stimulation chronique continue de basse intensité

Choix de la durée du programme

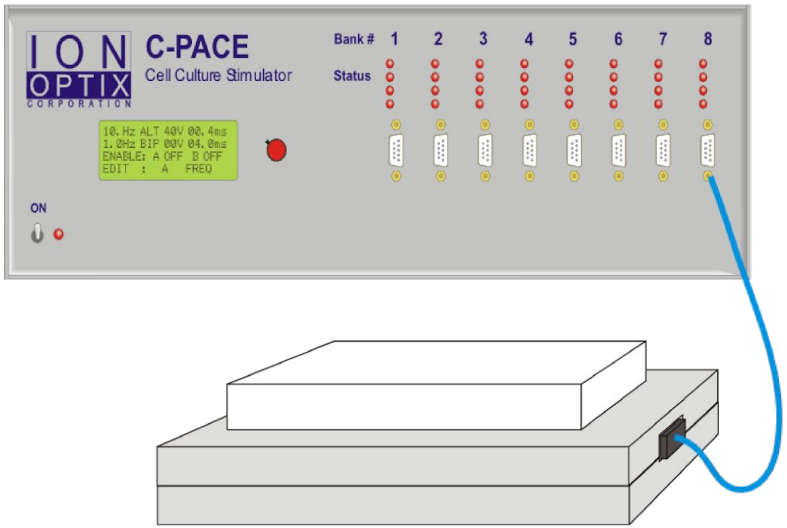
Une durée de stimulation d'au moins **48 h** apparaît nécessaire pour obtenir une augmentation significative de l'**activité des enzymes mitochondriales**

(Ex: Activité de la CS)

(Nikolić et al. 2012)

Paramètres d'électrostimulation

mimer l'AP chronique d'intensité modérée



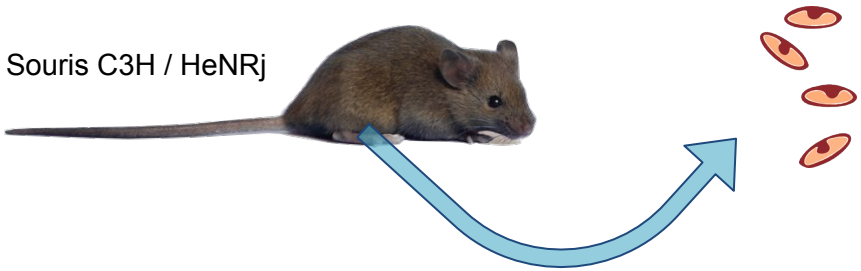
Stimulation **en continu**
Intensite: **1 Hz**
Voltage: 14V
Durée d'impulsion: 2 ms
Durée: **48 h** ou **72 h**



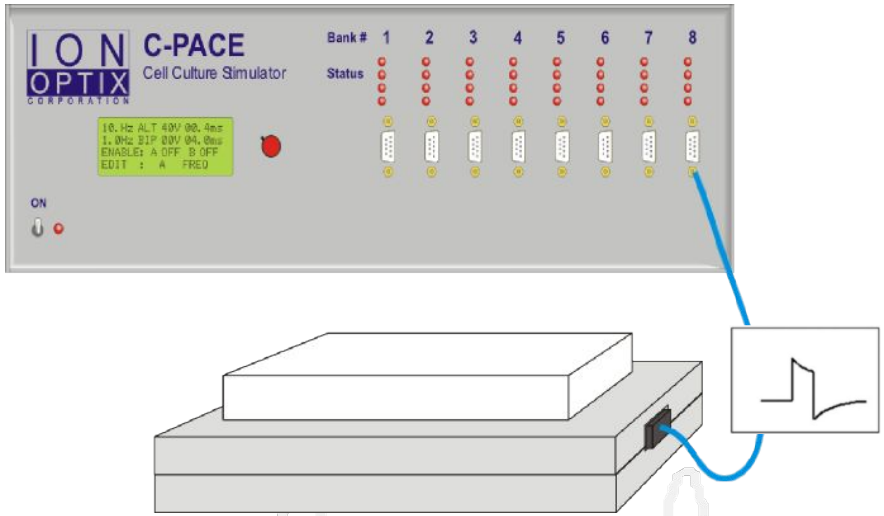
Objectif

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*

Modèle choisi:
Myotubes murins **C2C12**



Stimulateur **EPS**
"**E**lectrical **P**ulse **S**timulator"

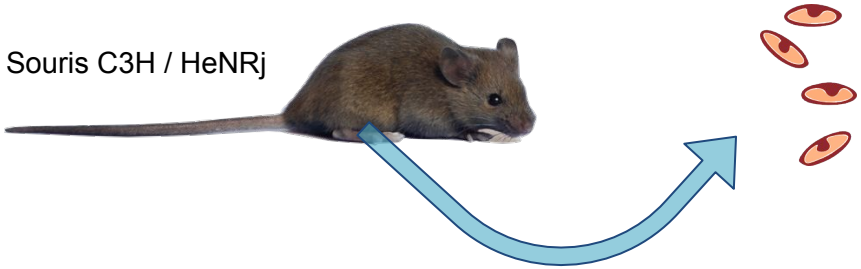


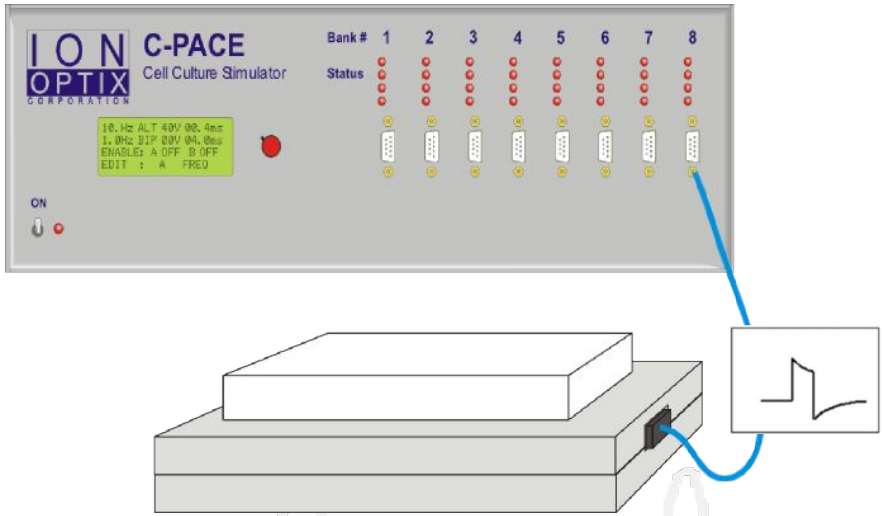
Objectif

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*

Modèle choisi:
Myotubes murins **C2C12**

Stimulateur **EPS**
"**E**lectrical **P**ulse **S**timulator"

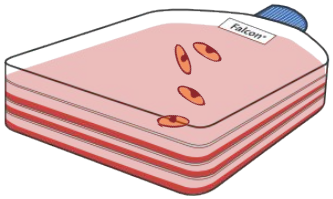




Il reste à choisir les **marqueurs de validation** du protocole et les **paramètres de stimulation**

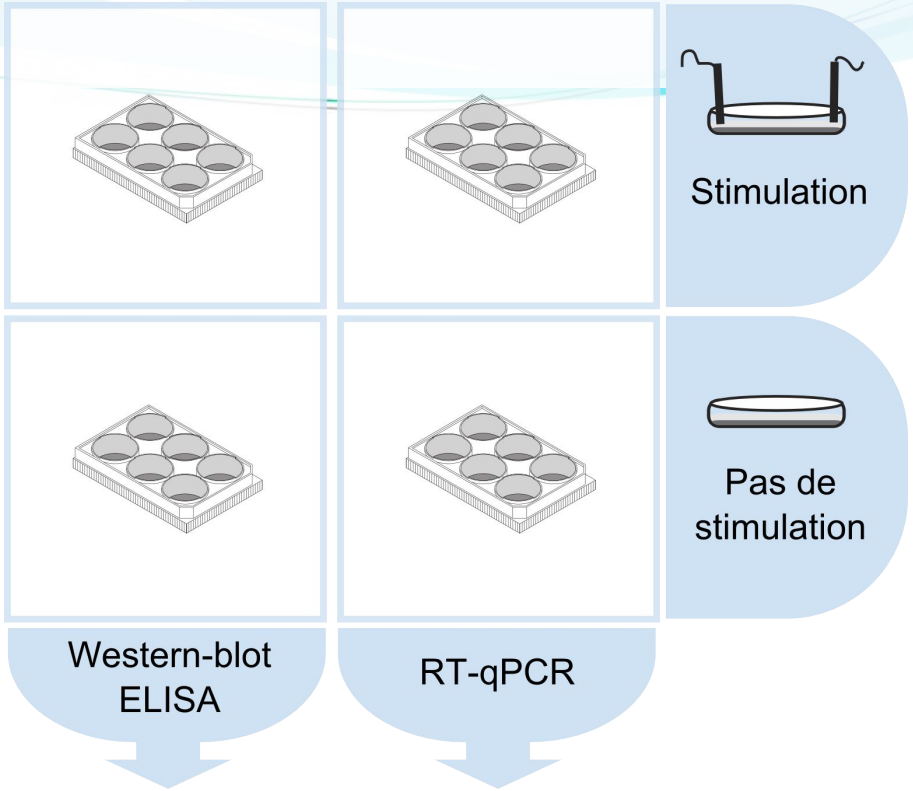
Matériel et Méthodes

Plan du protocole



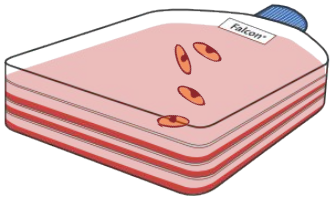
Myotubes C2C12

Prolifération / Différenciation



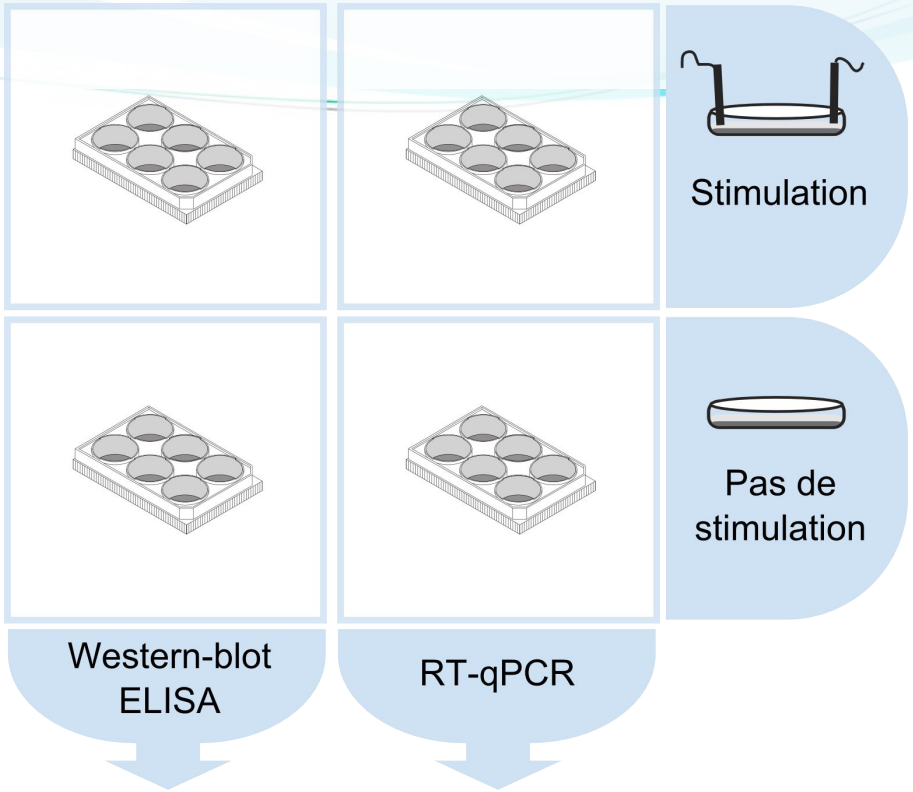
Matériel et Méthodes

Plan du protocole

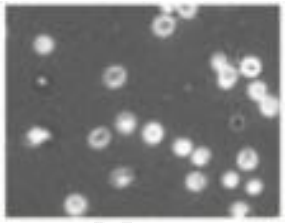


Myotubes C2C12

Prolifération / Différenciation

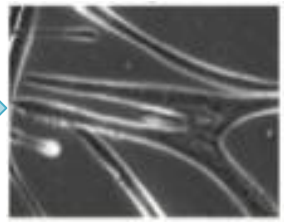


Expériences réalisées (1)



Myoblastes

Prolifération/Différenciation/Maturation



Myotubes

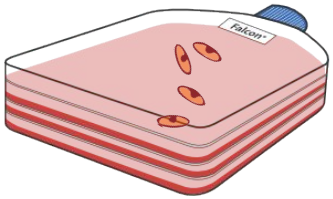
Vérification de la différenciation

WB et RT-qPCR:

-MyoD
-MRF
-Myf-4
-Myf-6
-MLP
-MYH 1,2,4 et 8

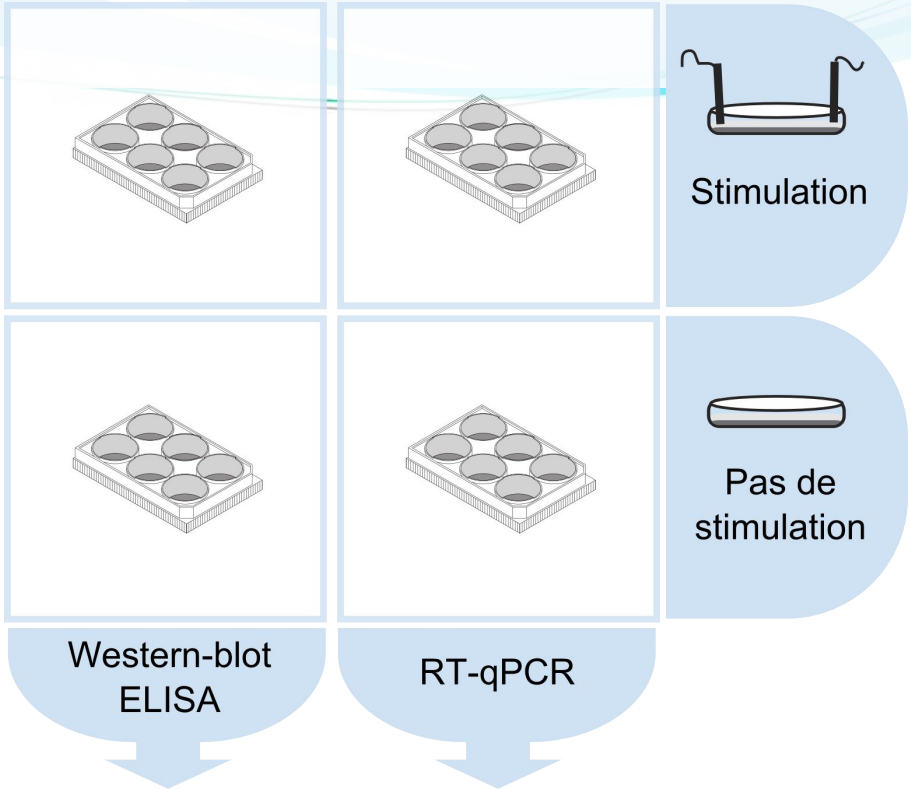
Matériel et Méthodes

Plan du protocole



Myotubes C2C12

Prolifération / Différenciation



Expériences réalisées (2)

Effets de la stimulation EPS

WB et RT-qPCR:

-PGC-1α

-MyHC-β

-MyHC-IIa

-Phospho-AMPK

-CS

ELISA et RT-qPCR:

-IL-6

Activité de la CS

Résultats attendus

Concentration et expression des marqueurs
MyoD, MRF, Myf-4, Myf-6, MLP, MYH 1,2,4
et 8 ↗

⇨ **Les myotubes sont bien différenciés**

Résultats attendus

Concentration et expression des marqueurs
MyoD, MRF, Myf-4, Myf-6, MLP, MYH 1,2,4
et 8 ↗

⇨ **Les myotubes sont bien différenciés**

Concentration **Phospho-AMPK**(Thr172) ↗
Concentration et expression de
PGC-1α, **IL-6** et **CS** ↗
Activité de la **CS** ↗

⇨ **Augmentation de la biogenèse mitochondriale**

Concentration et
expression de **MyHC-β** ↗

⇨ **Adaptation typologique des myotubes**

Résultats attendus

Concentration et expression des marqueurs
MyoD, MRF, Myf-4, Myf-6, MLP, MYH 1,2,4
et 8 ↗

⇨ **Les myotubes sont bien différenciés**

Concentration **Phospho-AMPK**(Thr172) ↗
Concentration et expression de
PGC-1α, **IL-6** et **CS** ↗
Activité de la **CS** ↗

⇨ **Augmentation de la biogenèse mitochondriale**

Concentration et
expression de **MyHC-β** ↗

⇨ **Adaptation typologique des myotubes**

Ces variations reflètent les adaptations du muscle squelettique à l'AP chronique d'intensité modérée

⇨ **Validation du protocole de stimulation**

Conclusion et perspectives

Si les résultats sont ceux attendus, ce protocole de stimulation EPS devrait permettre la récupération d'un sécrétome dans le milieu qui contient les myotubes

Perspectives

- Découvrir de nouvelles myokines dans le sécrétome
- Etudier les potentielles interactions entre myokines (Ex: OSM et SPARC)
- Etudier les rôles des myokines **IL-6**, **SPARC** et **OSM** dans les cancers

Conclusion et perspectives

Si les résultats sont ceux attendus, ce protocole de stimulation EPS devrait permettre la récupération d'un sécrétome dans le milieu qui contient les myotubes

Perspectives

- Découvrir de nouvelles myokines dans le sécrétome
- Etudier les potentielles interactions entre myokines (Ex: OSM et SPARC)
- Etudier les rôles des myokines **IL-6**, **SPARC** et **OSM** dans les cancers

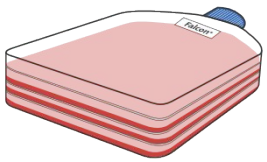
Sécrétome

IL-6

SPARC

OSM

traitement



Lignées tumorales

C26 carcinome du côlon murin

4T1
E0771 cancer du sein murin

Conclusion et perspectives

Si les résultats sont ceux attendus, ce protocole de stimulation EPS devrait permettre la récupération d'un sécrétome dans le milieu qui contient les myotubes

Perspectives

- Découvrir de nouvelles myokines dans le sécrétome
- Etudier les potentielles interactions entre myokines (Ex: OSM et SPARC)
- Etudier les rôles des myokines **IL-6**, **SPARC** et **OSM** dans les cancers

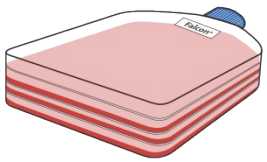
Sécrétome

IL-6

SPARC

OSM

traitement



Lignées tumorales

C26 carcinome du côlon murin

4T1
E0771 cancer du sein murin

- Mettre également en place d'autres protocoles EPS qui permettent de mimer l'AP **aiguë** ou **chronique intermittente** à différentes intensités
  - ⇨ Composition du sécrétome différente (Ex: **SPARC** davantage exprimé en aigu)

(Aoi et al. 2013)

Conclusion et perspectives

Si les résultats sont ceux attendus, ce protocole de stimulation EPS devrait permettre la récupération d'un sécrétome dans le milieu qui contient les myotubes

Limites de cette approche:

➢ Effet potentiel du milieu stimulé sans myotubes sur les tumeurs

Un effet de ce type a déjà été rapporté sur des cellules issues d'un hépatome (FAO, rat)

(Gogh et al. 2015)

Conclusion et perspectives

Si les résultats sont ceux attendus, ce protocole de stimulation EPS devrait permettre la récupération d'un sécrétome dans le milieu qui contient les myotubes

Limites de cette approche:

➢ Effet potentiel du milieu stimulé sans myotubes sur les tumeurs

Un effet de ce type a déjà été rapporté sur des cellules issues d'un hépatome (FAO, rat)

(Gogh et al. 2015)

➢ Ne permet pas d'étudier les effets sur le **microenvironnement tumoral**

(Remaniement de la **MEC** et **angiogenèse**)

⇨ Ne permet pas l'étude de certaines myokines comme la CHI3L1

Solution => Culture des lignées de cellules tumorales sur un **Matrigel** ?

Merci de votre attention

Annexes

Discussion

Contexte général (2)

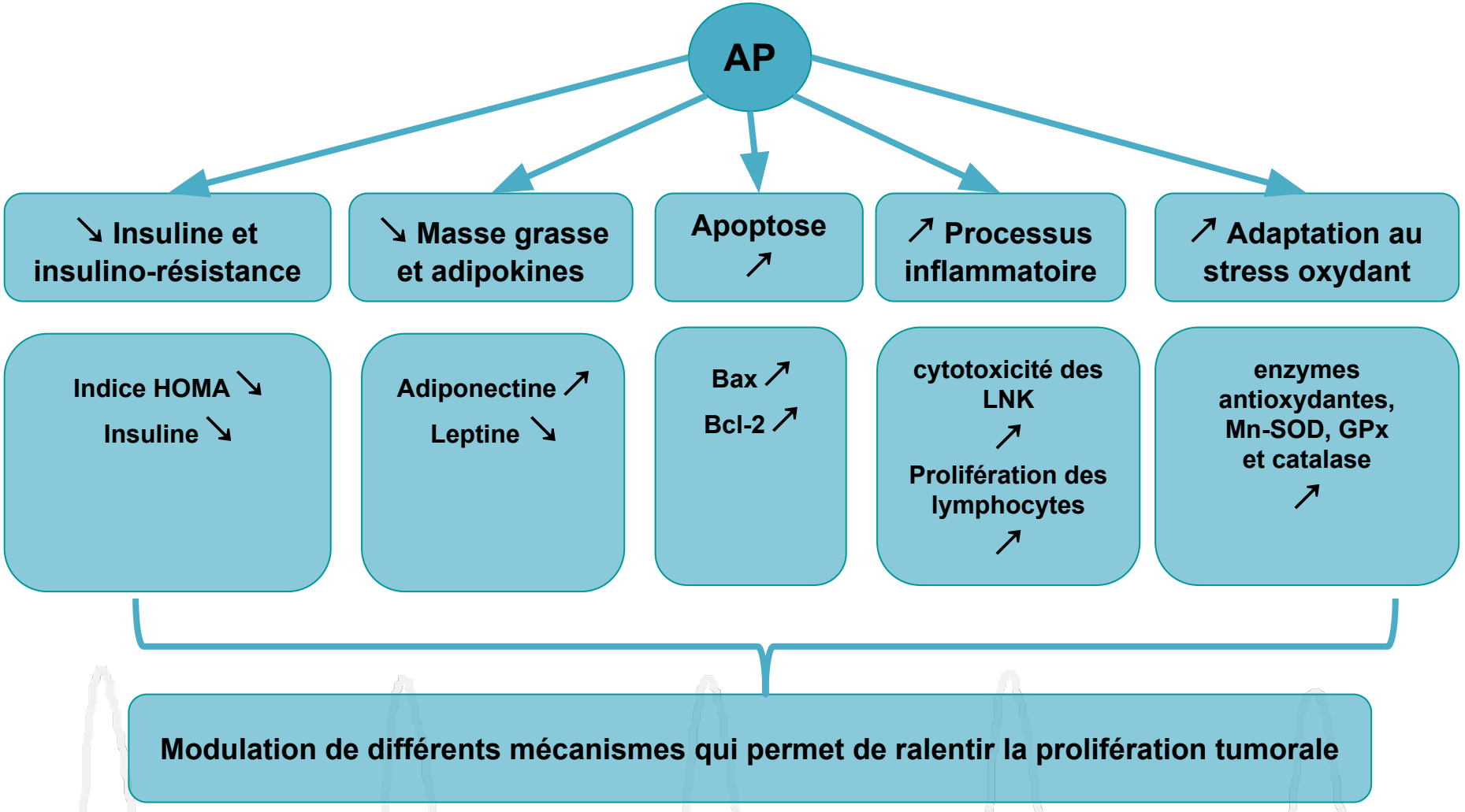
Types d'AP

Définir les types, fréquences, intensité d'AP pour qu'on comprenne le choix des paramètres EPS

Pourquoi le chronique c'est le plus intéressant?

Pourquoi chercher à mimer l'activité physique *in vitro* ?

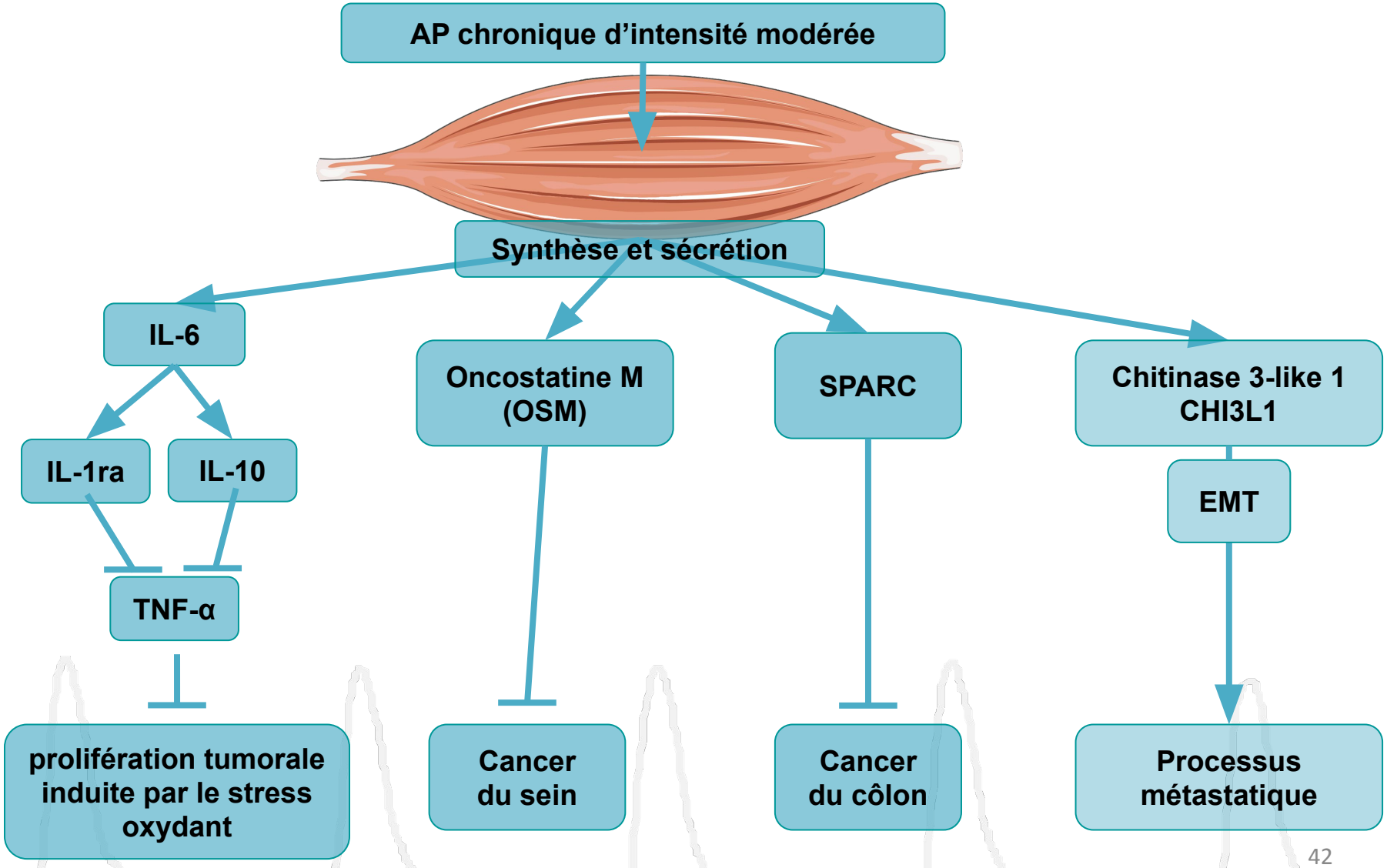
Effets de l'AP sur les mécanismes moléculaires liés à la progression tumorale



Importance de l'étude des voies de signalisation impliquées dans ces processus

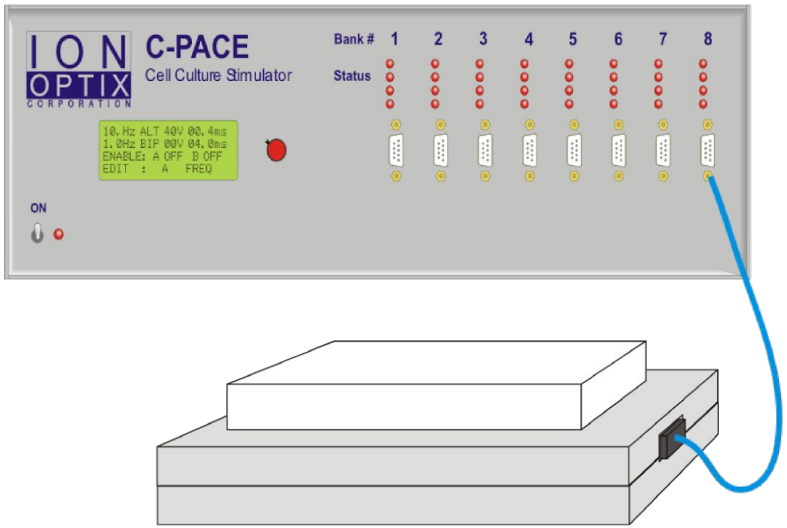
Pourquoi chercher à mimer l'activité physique *in vitro* ?

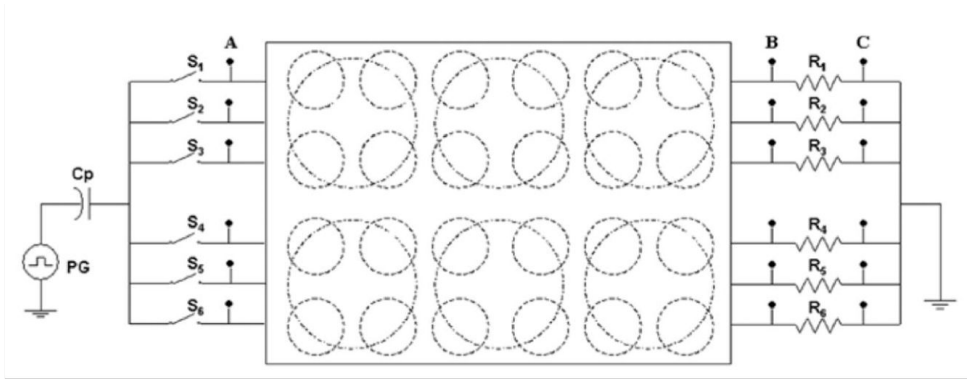
Production et sécrétion de facteurs par le MSS durant l'AP et effets sur les cancers

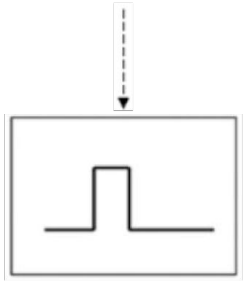


Méthode EPS

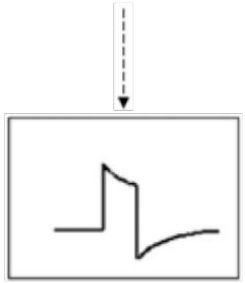
Stimulateur EPS





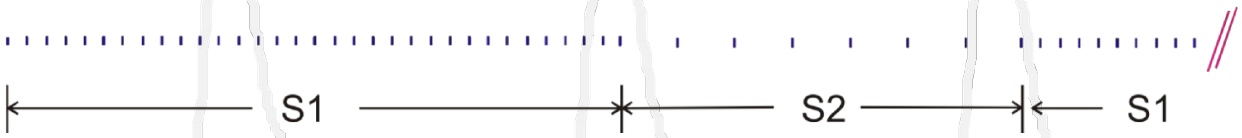


Forme d'impulsion du courant avant le condensateur



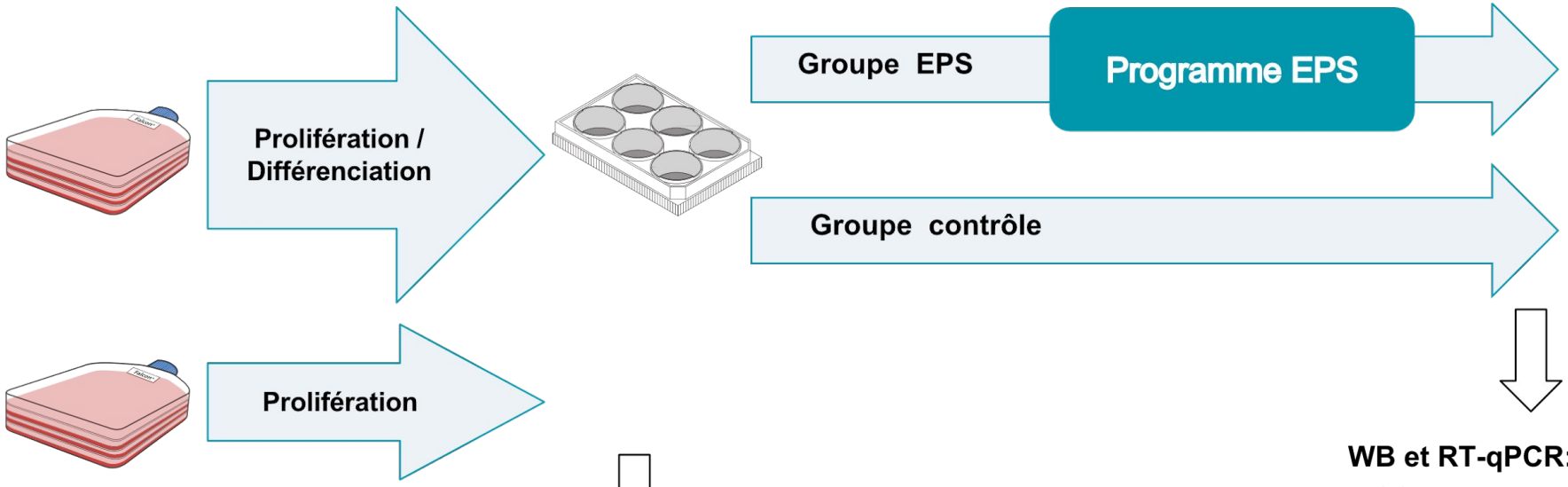
Forme d'impulsion du courant après le condensateur

Exemple de protocole d'exercice



Matériel et Méthodes

1. Plan du protocole



WB et RT-qPCR:

-MyoD
-MRF
-Myf-4
-Myf-6
-MLP
-MYH 1,2,4 et 8

WB et RT-qPCR:

-PGC-1α
-MHC-β
-MHC-IIa
-Phospho-AMPK
-CS

ELISA et RT-qPCR:

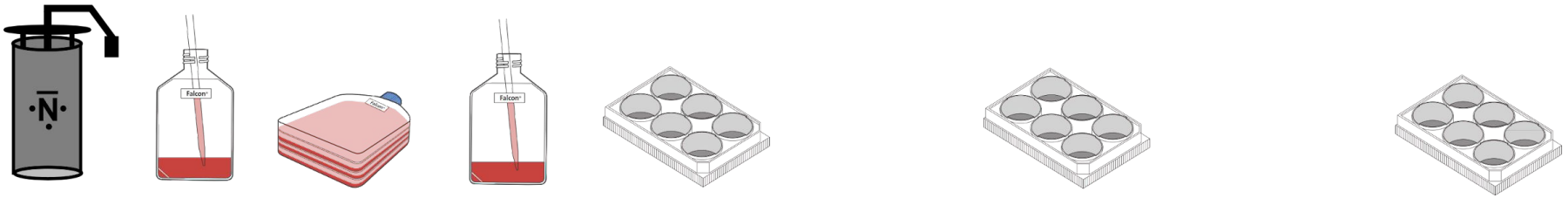
-IL-6

Activité de la CS

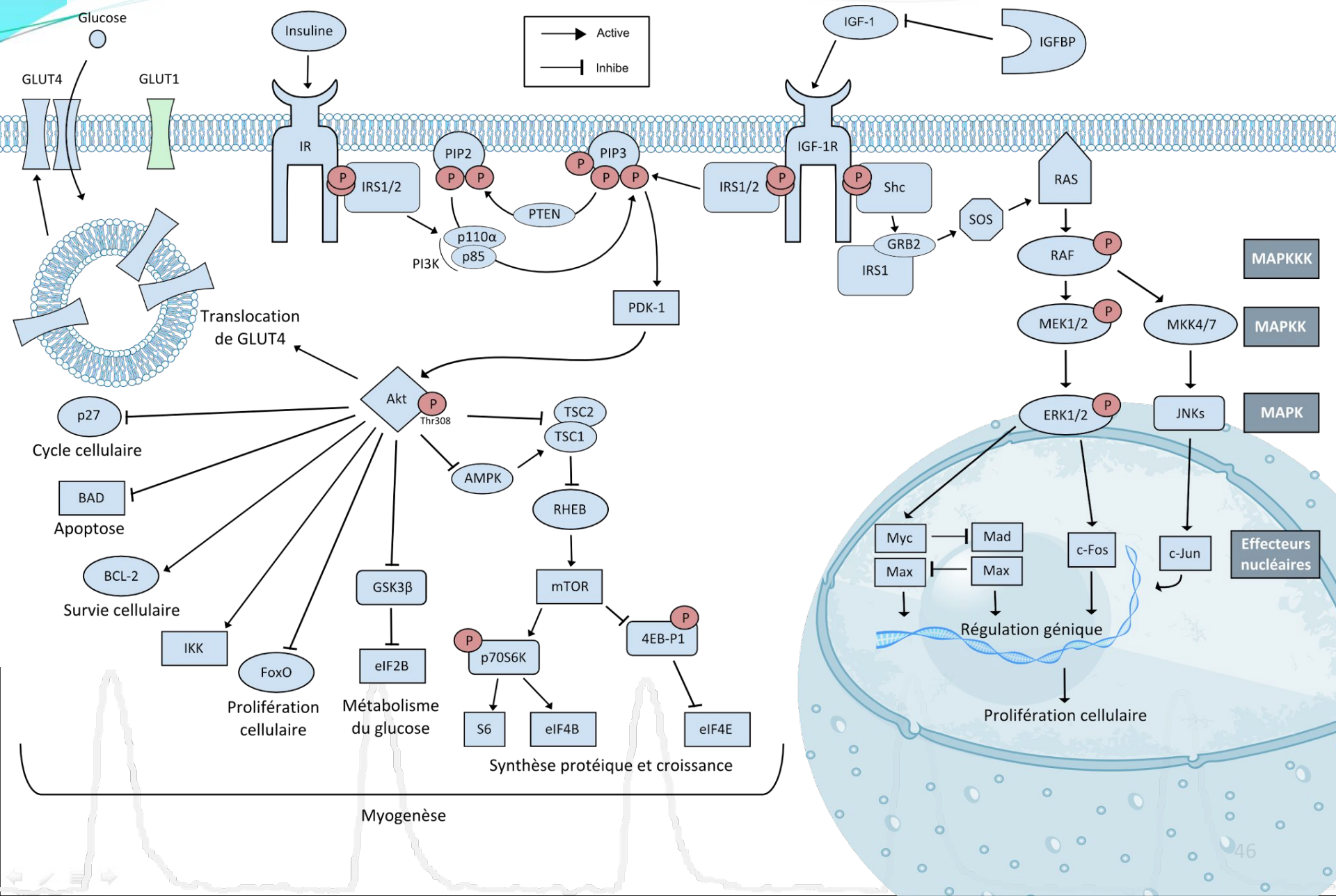
Matériel et Méthodes

1. Plan du protocole

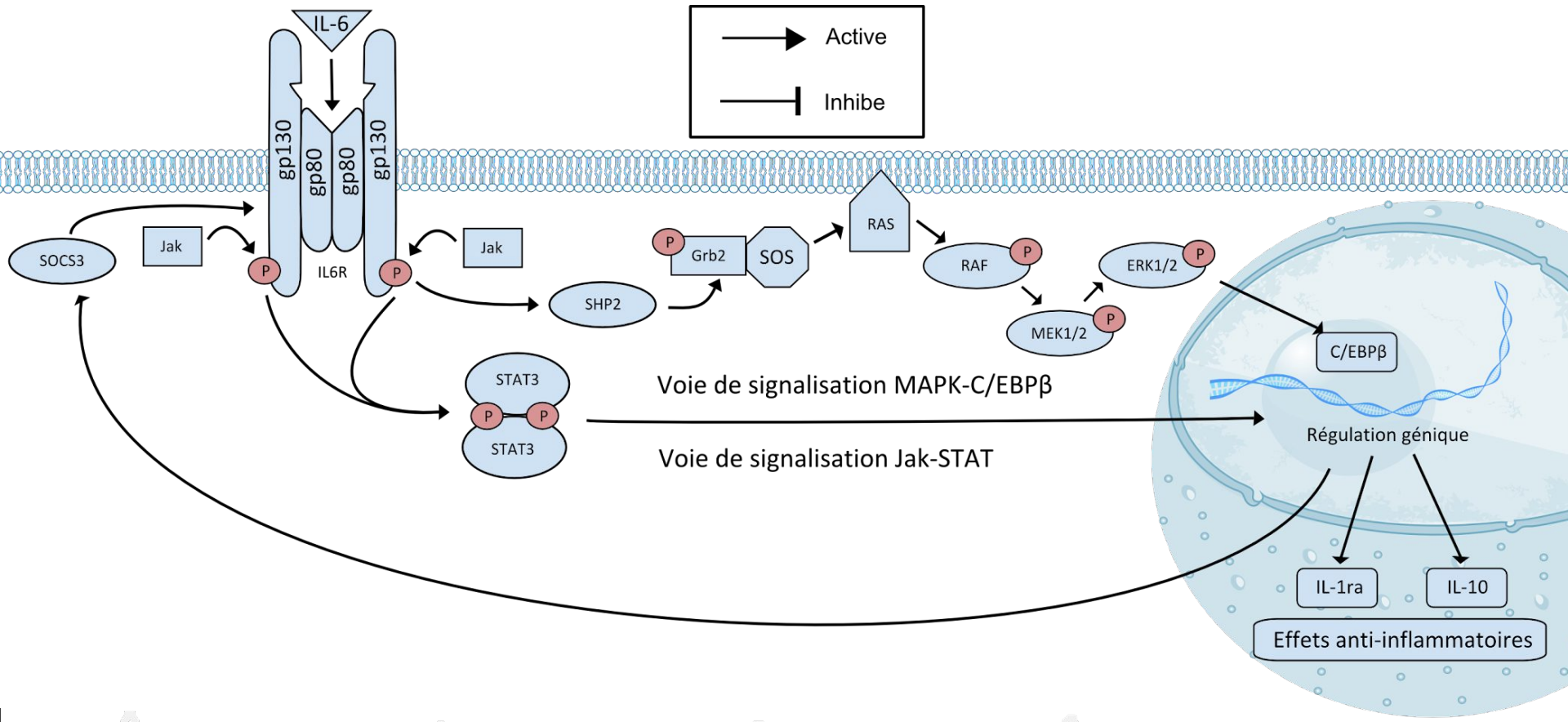
1.1. Culture cellulaire



Voies de signalisation de l'insuline et de l'IGF-1



Voies de signalisation de l'IL-6



4. Les marqueurs à tester pour vérifier la différenciation et la contraction des myocytes

4.1. Détermination de la méthode de vérification de la différenciation complète des cellules satellites en myoblastes, puis en myotubes

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 I: Les différentes myokines actuellement connues (1)

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

Tableau I: Les différentes myokines actuellement connues (2)

Myokine	Gène	Espèce	Référence
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 X: Les différents types de fibres des MSS

	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 3: Anticorps primaires utilisés pour les WB

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: Amorces utilisées pour les RT-qPCR

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'

Ancienne version du diapo

AP, cancers et adipokines

Enfin, l'activité physique modifie les sécrétions d'adipokines issues des tissus graisseux, elle fait grimper le taux d'adiponectine qui freine la prolifération cancéreuse et baisser le taux de leptine qui au contraire stimule la multiplication des cellules cancéreuses. L'activité physique agit donc directement sur trois métaboliques, estrogènes, insuline, adipokines ce qui entraîne un abaissement du risque de rechute.

	Taux Exercice / contrôle	p
INSULINE	0.87 (0.81-0.93)	<0.001
HOMA	0.86 (0.80-0.93)	<0.001
LEPTINE	0.82 (0.78-0.87)	<0.001
R ADIPONECTINE/ LEPTINE	1.21 (1.13-1.28)	<0.001

AP et Insulino résistance, Insuline, Adipokines ALPHA STUDY

En conclusion, contrairement à ce que l'on a longtemps, cru, l'activité physique n'est pas dangereuse si elle est pratiquée sous le contrôle d'éducateurs sportifs formés en cancérologie. Elle est non seulement le seul traitement validé de la fatigue du patient cancéreux, mais aussi un facteur clé incontournable dans la prévention des rechutes.

Effets de l'AP sur différents organes

Organes	Actions favorables	Type d'activité
Muscles	Augmentation - Maintien Force Vitesse Elasticité Endurance	Musculation Vélocité Saut, gym, étirement, sports de fond
Squelette	Stabilise ou augmente la calcification, évite l'ostéoporose	contrainte de la pesanteur
Coeur	Musculation, diminution de fréquence de repos	Résistance Endurance

2. Description du matériel

2.1. Le stimulateur électrique

Exercise Protocols

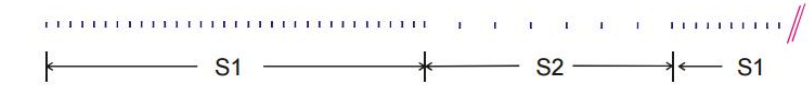
Run multiple pulse trains with individually programmable frequency and duration.

```
^Enabled
 S1 2.0Hz 060m
_S2 1.0Hz 660m 212m
 End of Sequence
```

Define step one of the sequence to be a pulse train with desired frequency and length.

Define step two of the sequence to be a pulse train with desired frequency and length.

Define step three of the sequence to be the End of Sequence.



Tiré du guide d'utilisateur du C-Pace EP (IonOptix), version révisée 7.2, Août 2011, p17

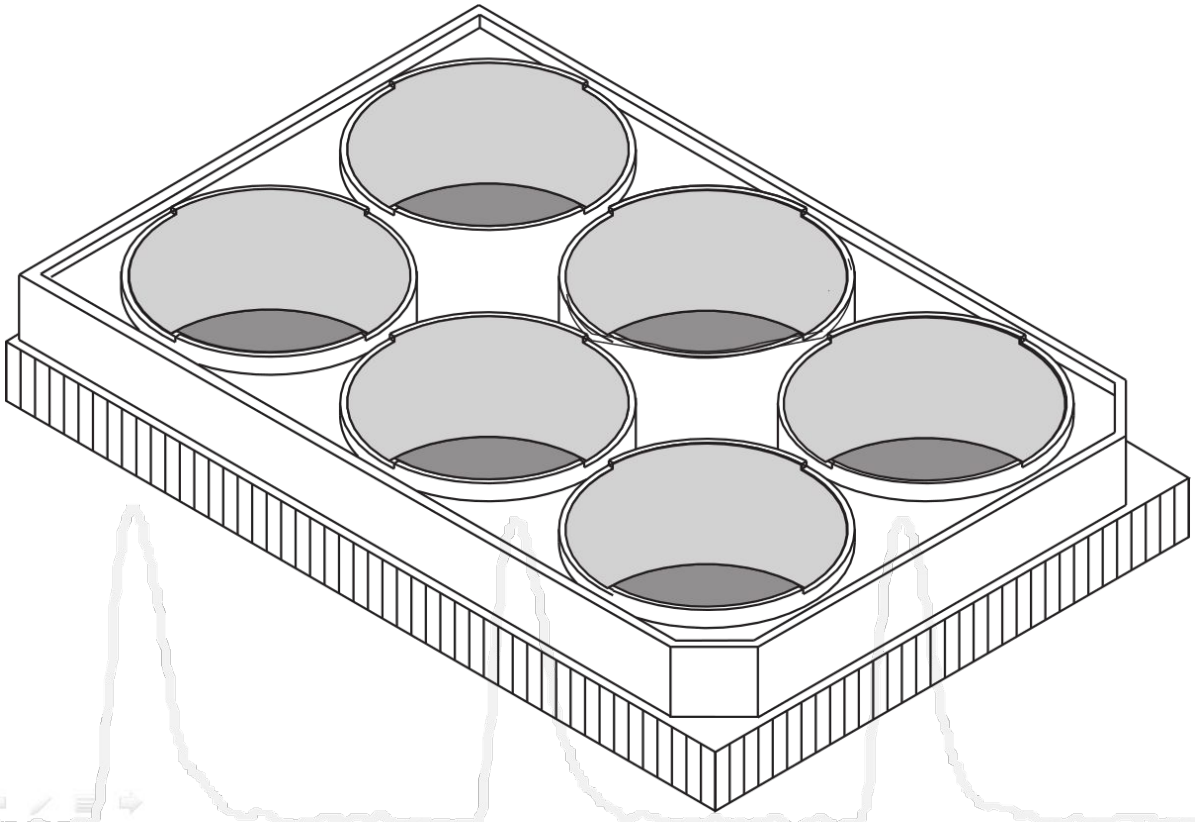


C-Pace EP with optional 6-well C-Dish electrode assembly

2. Description du matériel

2.2. Les boîtes de culture adaptées au système d'électrostimulation chronique de cellules en culture

Plateau de 6 boites de culture individuelles de 35 mm de diamètre (6 Individual 35 mm Dishes, C-Dish, IonOptix)





1. Description de la lignée de myocytes murins utilisée: C2C12

Origine : Souris C3H / HeNRj

Localisation anatomique: Muscle de la cuisse (Thigh muscle)



TYPE: Souris consanguine

COULEUR ET GÉNOTYPE ASSOCIÉ :

Souris agouti, *A/A* - MHC : Haplotype $H2^k$

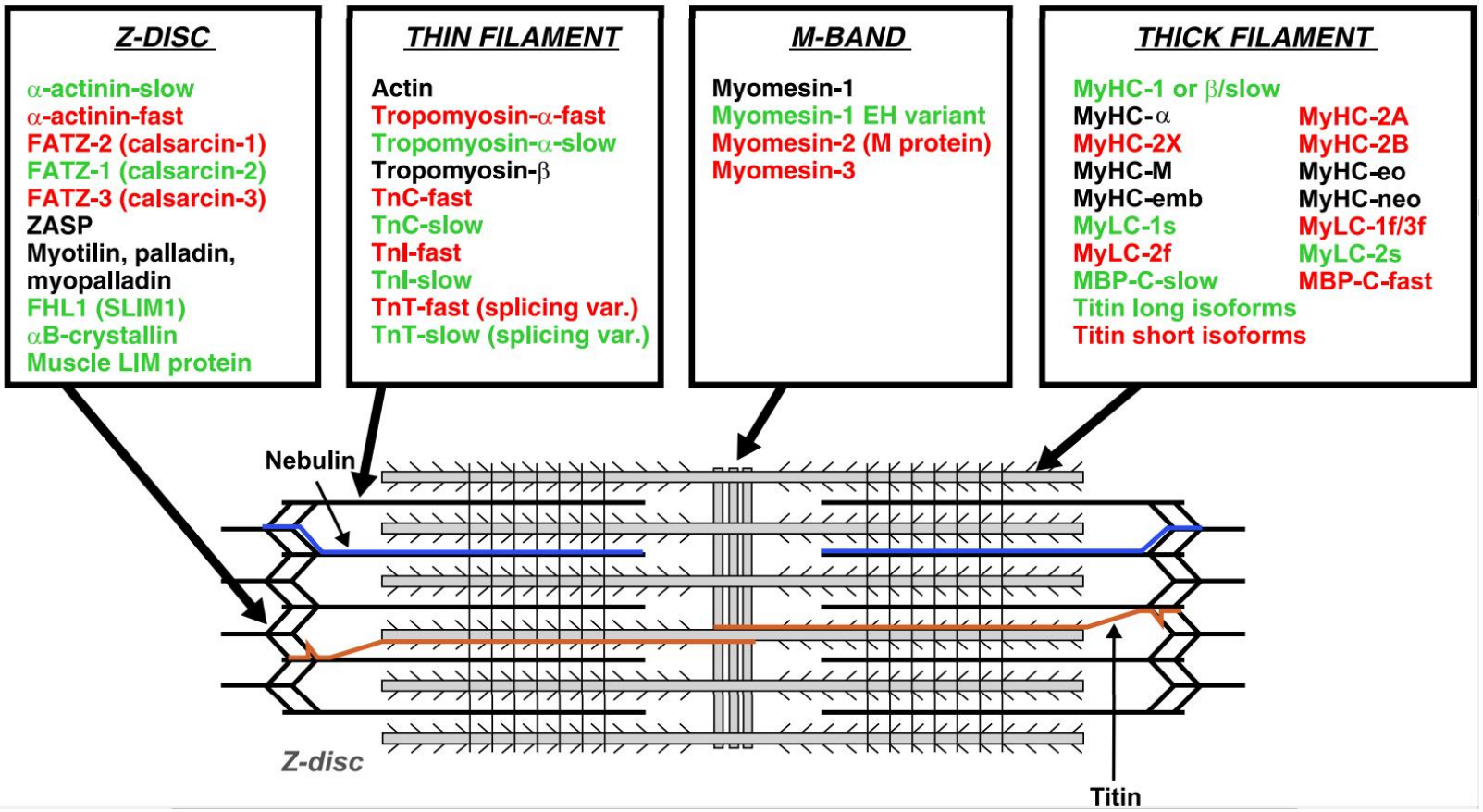
ORIGINE : National Institutes of Health (USA) - 1996 (F169)

PERFORMANCES DE REPRODUCTION : Animal excellent reproducteur

C3H/**He**	
He = Hépatome Incidence élevée d'hépatome pas d'athérosclérose aortique avec un régime athérogène spécifique	
C3H/He**N** (Normal)	C3H/He**J**
LPS **sensible**	LPS **insensible**

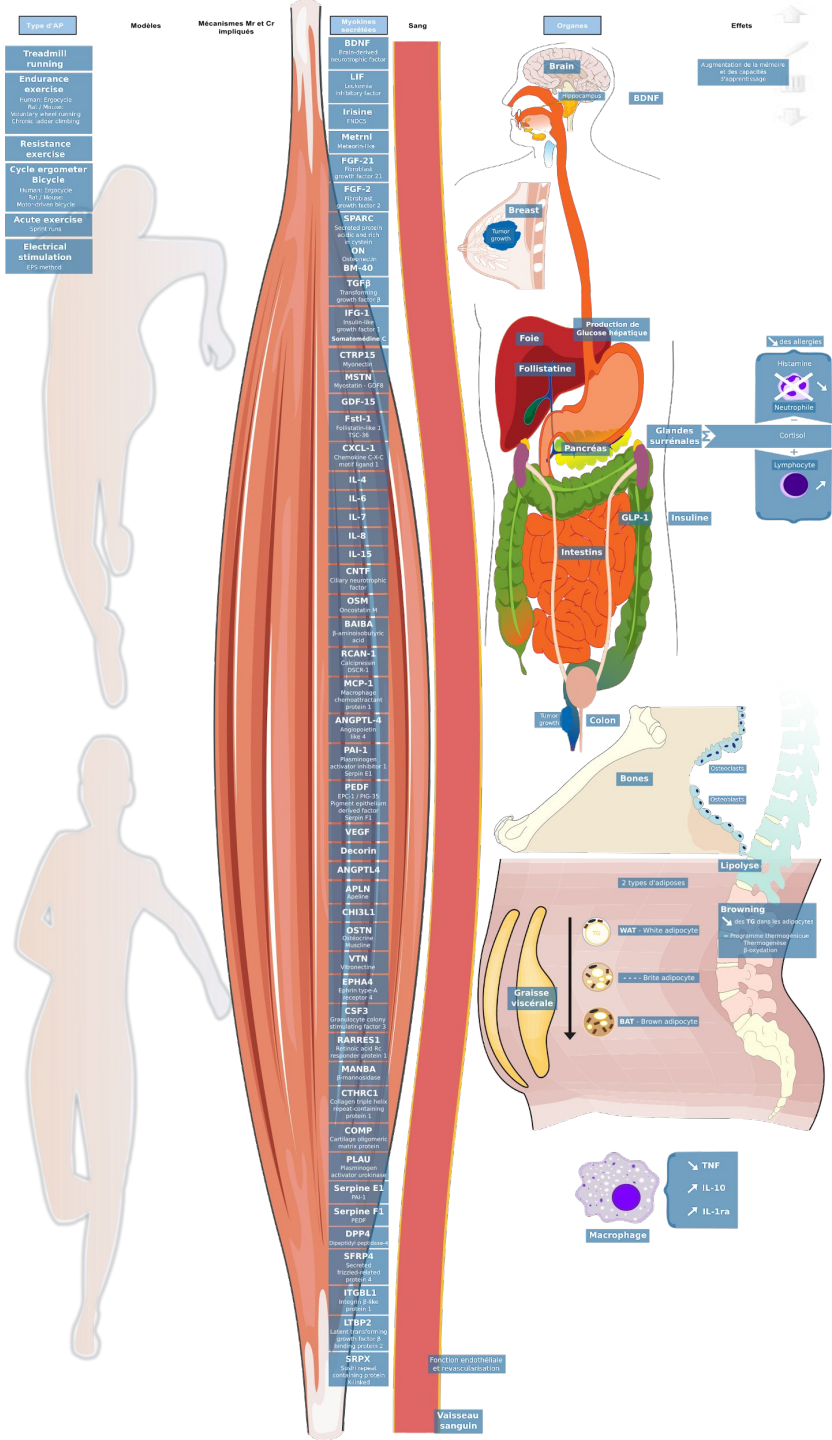
C2C12, ATCC: CRL-1772

Sarcomère



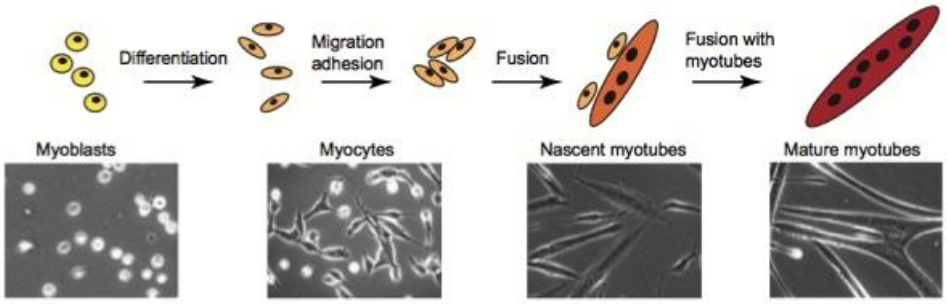
(Schiaffino et Reggiani 2011)

Myokinome



wip =>

Overview of Myotube formation

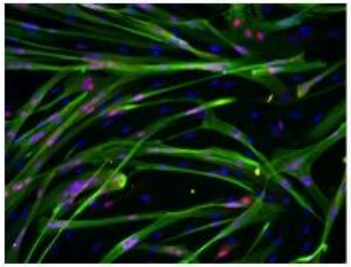


Abmayr SM, Pavlath GK, Development. 2012 Feb;139(4):641-56

Skeletal muscle fibers are syncytia that arise from the sequential fusion of myoblast cells. The process involves i) the differentiation of myoblasts into myocytes, ii) the fusion of myocytes to form nascent myotubes and iii), additional fusion of myocytes with nascent myotubes to form more mature myotubes.

In vitro model

Immunostaining:
- Myosin Heavy chain
- Myogenin
- Hoescht



Myotubes formed in standard culture condition are very heterogeneous in size and shape forming sometimes large structure that are poorly compatible with High Content Analysis approaches.

1er STADE : MYOBLASTES

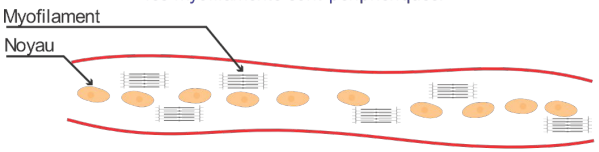
Ce sont des cellules fusiformes possédant un noyau unique.



FUSION

2e STADE : MYOTUBES

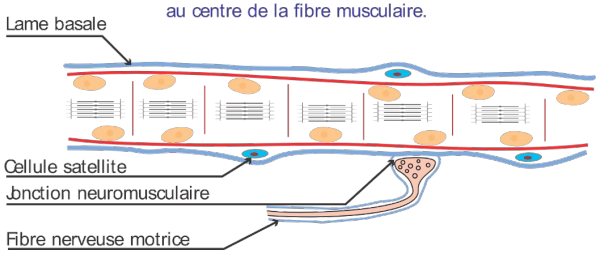
Plusieurs myoblastes fusionnent avec des myoblastes voisins, les noyaux s'accolent et forment une chaîne centrale, les myofilaments sont périphériques.

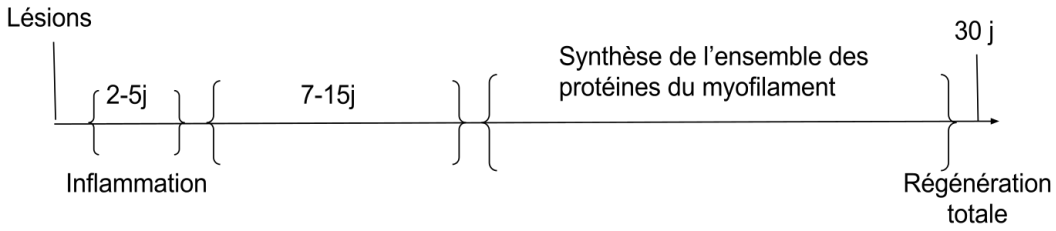


DIFFÉRENCIATION

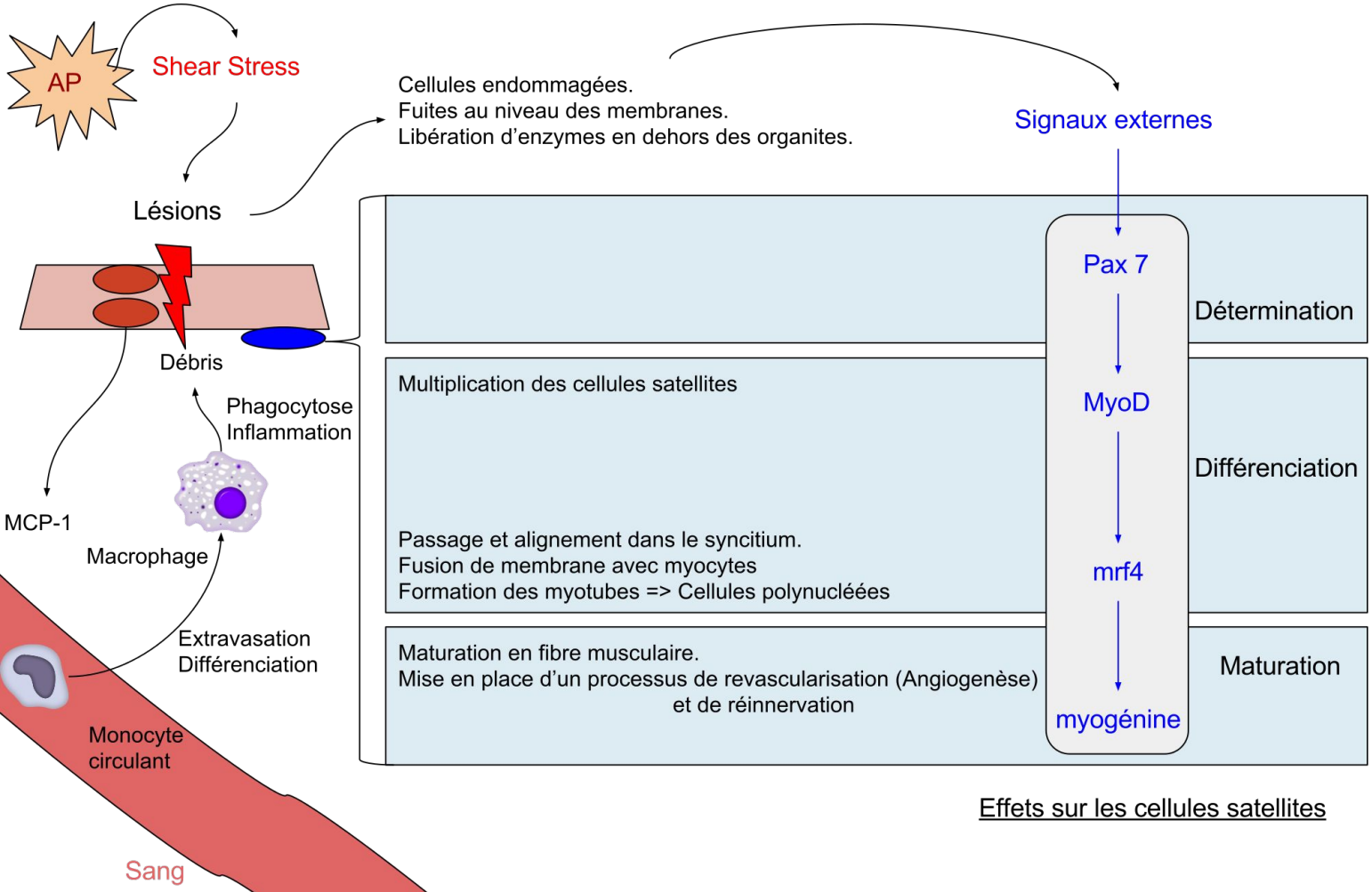
3e STADE : FIBRE MUSCULAIRE

Les noyaux prennent une position périphérique alors que les myofilaments sont localisés au centre de la fibre musculaire.

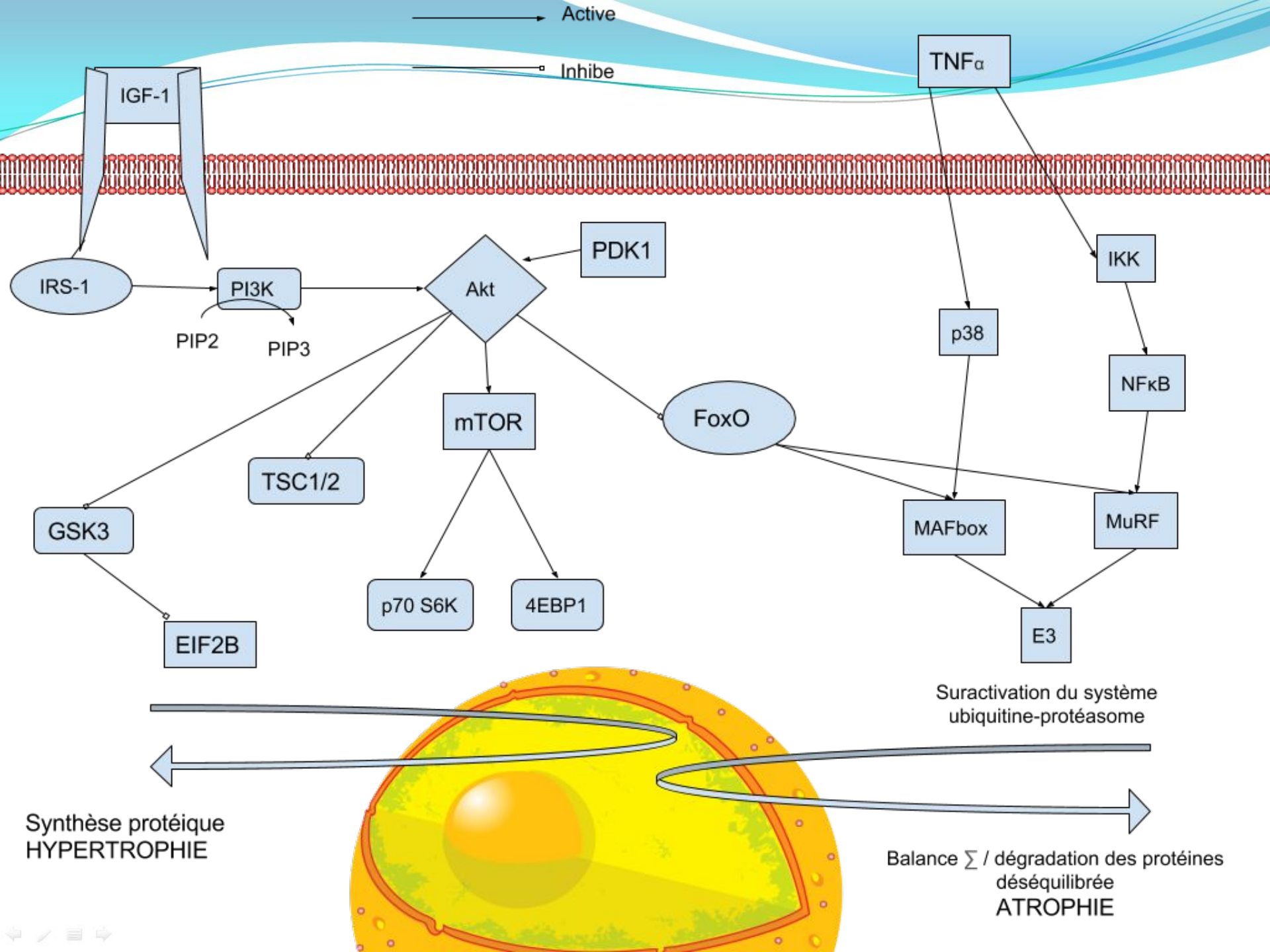




Prolifération des cellules satellites
Différenciation en myoblastes
Fusion des myoblastes = Début du syncitium
= Cellules plurinucléées
= Myotubes



Effets sur les cellules satellites


Active
Inhibe
IGF-1
TNFα
IRS-1
PI3K
PIP2
PIP3
Akt
PDK1
IKK
p38
NFκB
mTOR
FoxO
TSC1/2
GSK3
MAFbox
MuRF
p70 S6K
4EBP1
EIF2B
E3
Suractivation du système ubiquitine-protéasome
Synthèse protéique
HYPERTROPHIE
Balance ∑ / dégradation des protéines déséquilibrée
ATROPHIE

4. Les marqueurs à tester pour vérifier la différenciation et la contraction des myocytes

4.1. Détermination de la méthode de vérification de la différenciation complète des cellules satellites en myoblastes, puis en myotubes

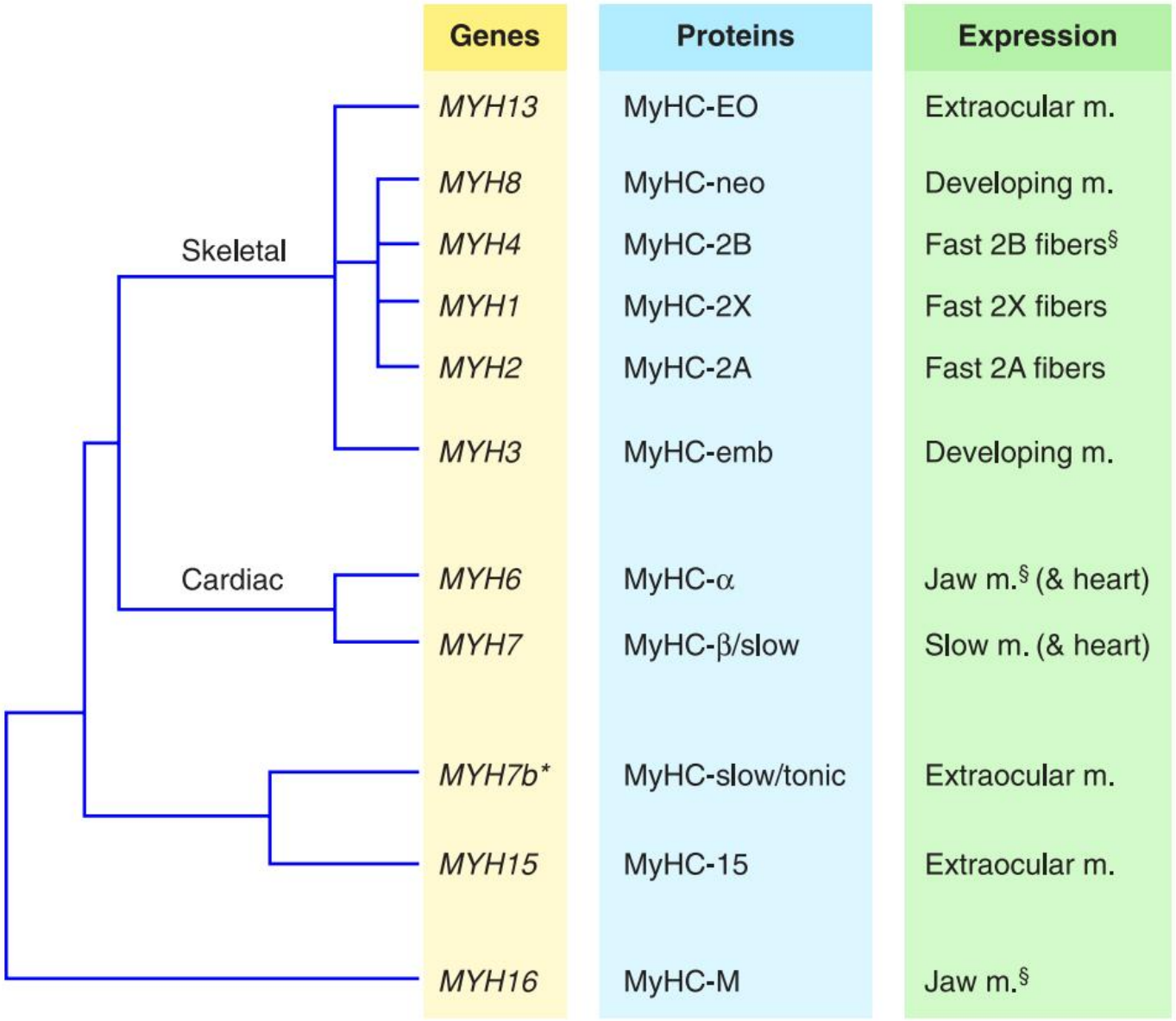
Etat des cellules en culture	Cellules satellites (Progéniteur)		Myoblastes (Précurseur)		Fibres musculaires (Myotubes)
Processus en cours	Quiescence	Activation	Prolifération	Différenciation	Maturation
Gènes exprimés:					
syndécanes 3/4					
m-cad					
CD34					
Pax-3					
Pax-7					
Myf-5					
MyoD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

4. Les marqueurs à tester pour vérifier la différenciation et la contraction des myocytes

4.1. Détermination de la méthode de vérification de la différenciation complète des cellules satellites en myoblastes, puis en myotubes

Facteurs de régulation myogéniques			
Protéines à domaine hélice-boucle-hélice basique			
MyoD	Myf-4	Myf-5	Myf-6
	(= **Myogénine**)		(= **Mrf-4**) = Herculine

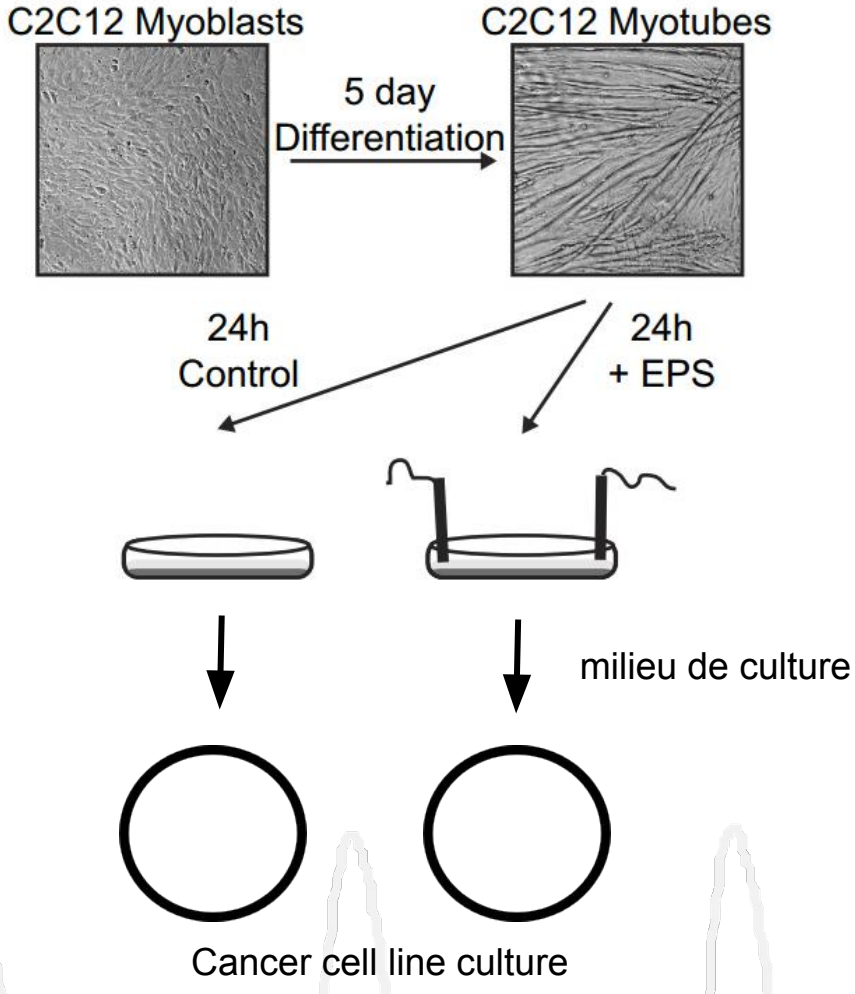
4. Les marqueurs à tester pour vérifier la différenciation et la contraction des myocytes



(Schiaffino et Reggiani 2011)

1. Description des différents modèles d'EPS

1.1. Protocoles de type "EPS sur des cultures de myocytes (en confluence) adhérant à une surface"



(Adapté de Evers-van Gogh, 2015)

1. Description des différents modèles d'EPS

1.2. Autres types de protocoles, tels que celui-ci, qui s'attache à reproduire un modèle plus fidèle à l'architecture cellulaire d'un muscle strié squelettique (Matrigel, MEC, 3D)

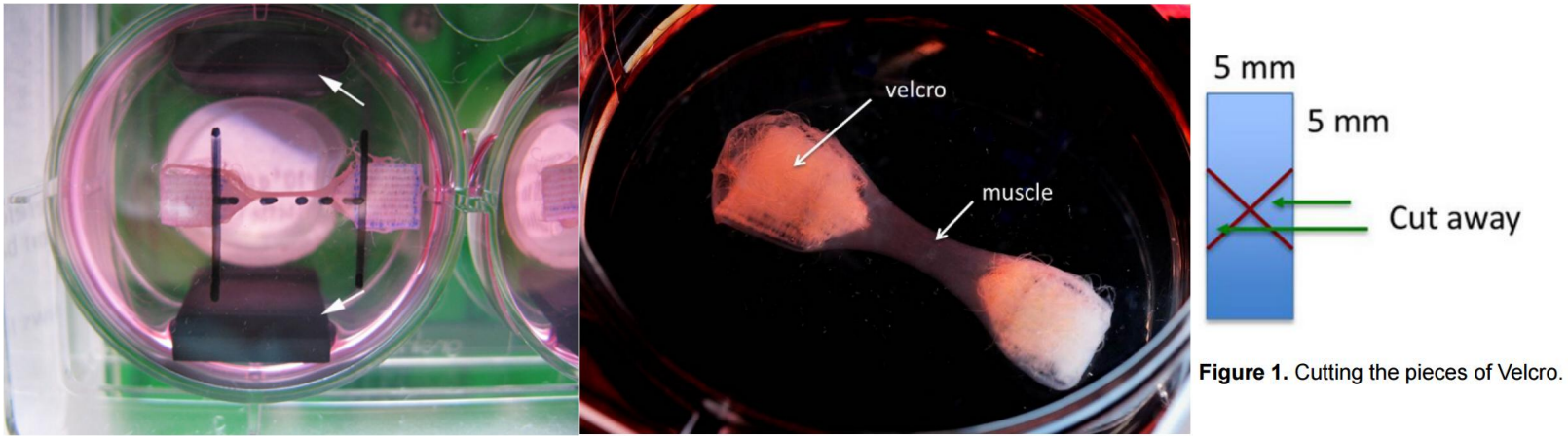


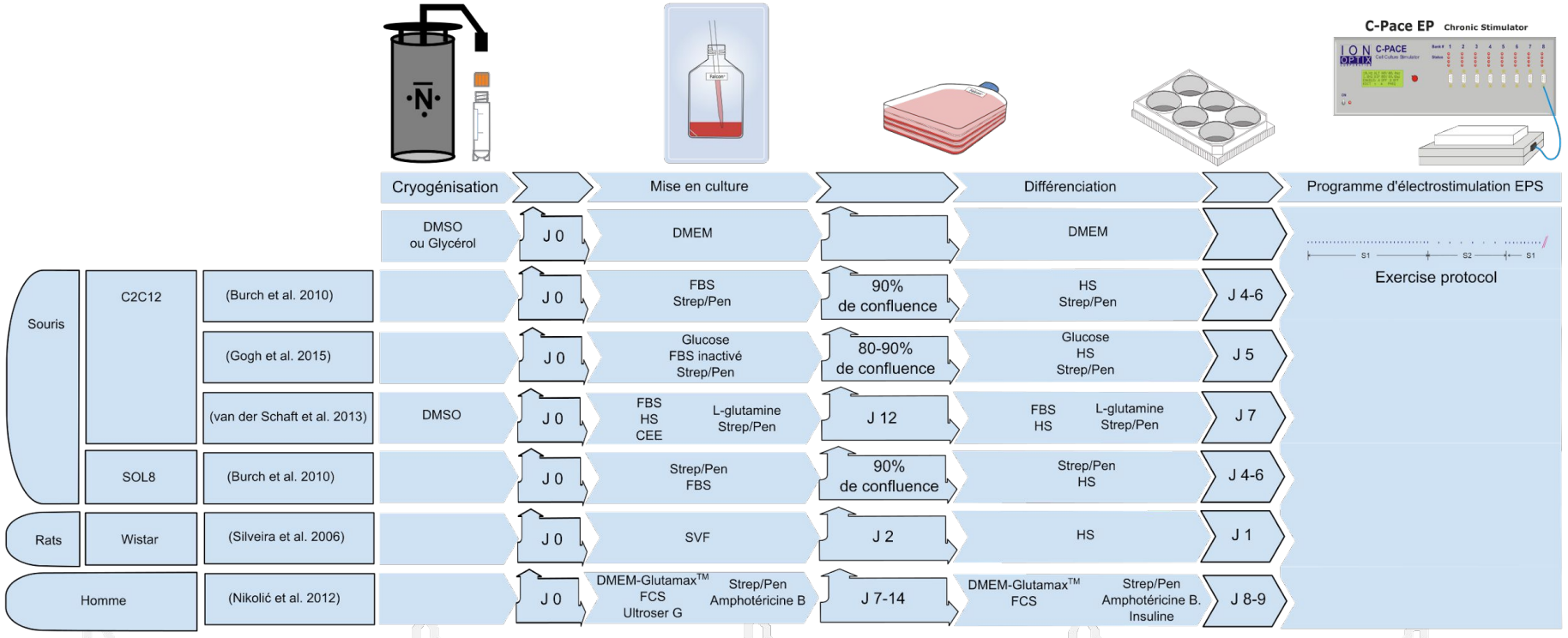
Figure 1. Cutting the pieces of Velcro.

Extrait de van der Schaft et al. 2013

Matériel et Méthodes

1. Mise en place d'un protocole

1.1. Basé sur une revue de littérature (1)

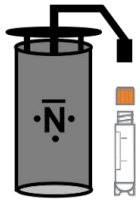


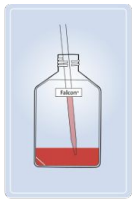
Matériel et Méthodes

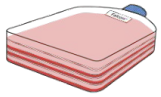
1. Mise en place d'un protocole

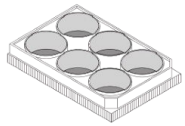
1.1. Basé sur une revue de littérature (2)

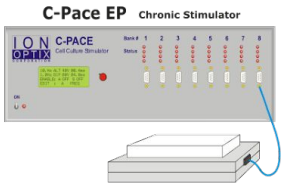
Protocoles réalisés sur des myocytes C2C12











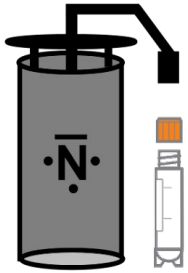
			Cryogénisation		Mise en culture		Différenciation		Programme d'électrostimulation EPS
Souris	C2C12	(Burch et al. 2010)	DMSO ou Glycérol	J 0	DMEM		DMEM		Exercise protocol
		(Gogh et al. 2015)		J 0	FBS Strep/Pen	90% de confluence	HS Strep/Pen	J 4-6	
		(van der Schaft et al. 2013)		J 0	Glucose FBS inactivé Strep/Pen	80-90% de confluence	Glucose HS Strep/Pen	J 5	
			DMSO	J 0	FBS HS CEE L-glutamine Strep/Pen	J 12	FBS HS L-glutamine Strep/Pen	J 19	

Matériel et Méthodes

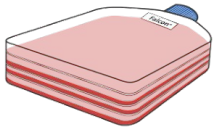
1. Mise en place d'un protocole

1.1. Basé sur une revue de littérature (3)

Protocoles réalisés sur des myocytes C2C12





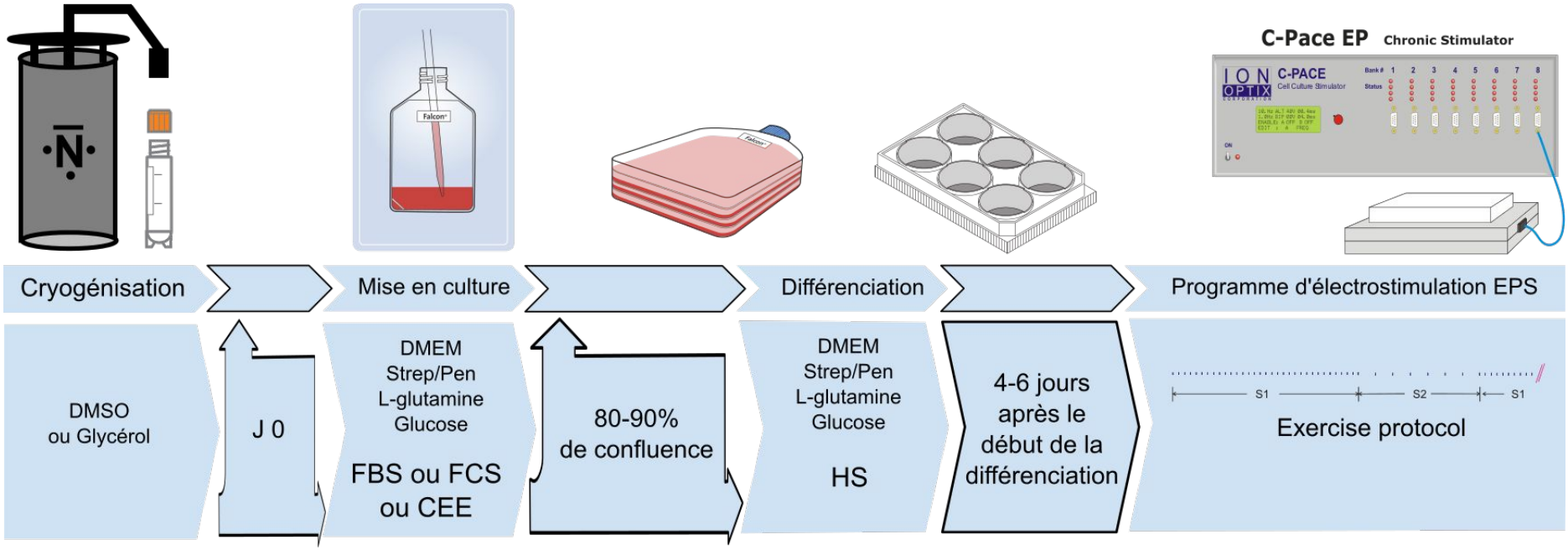


	Cryogénisation		Mise en culture		Différenciation	
	DMSO ou Glycérol	J 0	DMEM		DMEM	
(Burch et al. 2010)		J 0	FBS Strep/Pen	90% de confluence	HS Strep/Pen	J 4-6
(Gogh et al. 2015)		J 0	Glucose FBS inactivé Strep/Pen	80-90% de confluence	Glucose HS Strep/Pen	J 5
(van der Schaft et al. 2013)	DMSO	J 0	FBS HS CEE L-glutamine Strep/Pen	J 12	FBS HS L-glutamine Strep/Pen	J 19

Matériel et Méthodes

1. Mise en place d'un protocole

1.1. Protocole proposé (1)



Matériel et Méthodes

1. Mise en place d'un protocole

1.1. Protocole proposé (2)

Matériel et Méthodes

1. Mise en place d'un protocole

1.1. Choix des paramètres d'électrostimulation

	Aigu	Intermittent	Continu
Durée EPS	Une fois 90 min	plusieurs fois 90 min à intervalle régulier durant 4 jours	24 h

D'après Burch et al. 2010

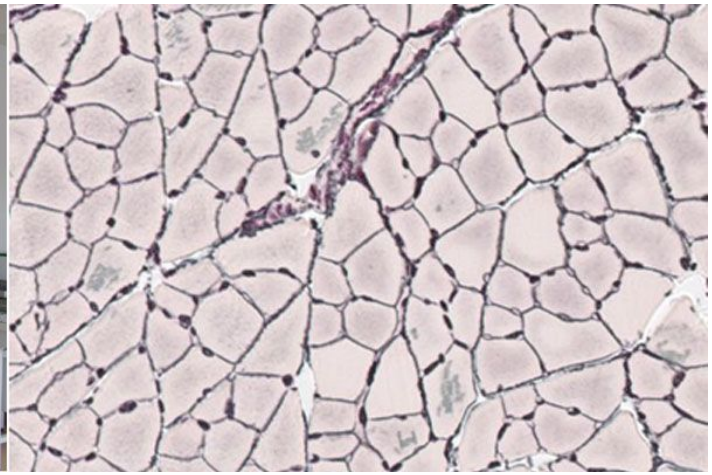
4. Les marqueurs à tester pour vérifier la différenciation et la contraction des myocytes

Sujet de stage

- Mise en place d'un modèle de stimulation électrique de cellules musculaires pour mimer l'exercice in vitro

Avec Amélie Rebillard au laboratoire M2S





Site du laboratoire M2S

Proposition de mémoire

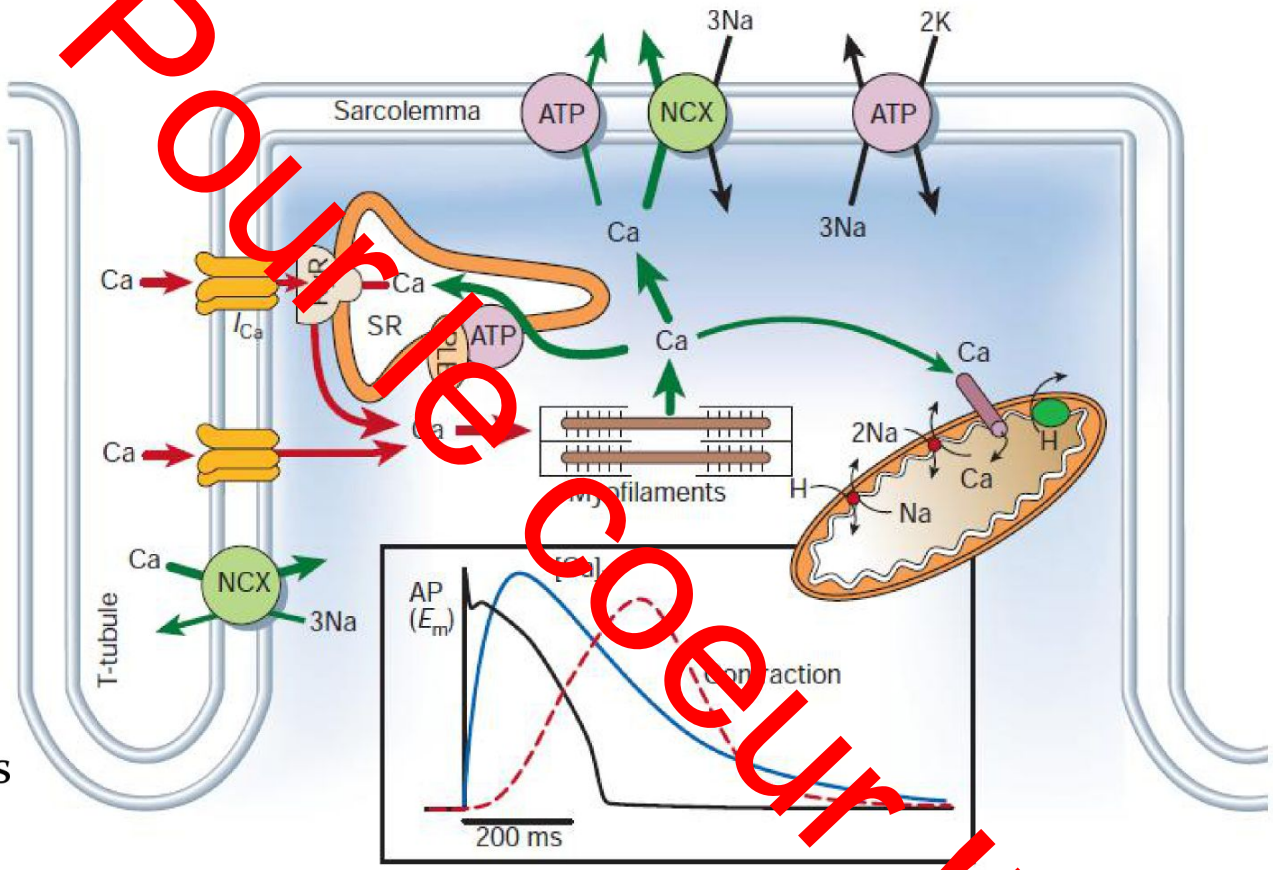
- Pas encore de problématique



C-Pace EP with optional 6-well C-Dish electrode assembly

Interrogations éventuelles

Couplage E-C



Pour le coeur !!!!

-Stimulation électrique des cardiomyocytes ventriculaires
-Sarcomères
-Contraction myocardique
-Ca^{2+}, messager ubiquitaire
-Canal calcique ICaL
-Récepteur canal RYR
-Reticulum sarcoplasmique
-mécanisme de CICR
-Pompe SERCA du RS
-Echangeur NCX