

**CARACTÉRISATION MORPHOLOGIQUE ET MOLÉCULAIRE DES  
VÉSICULES EXTRACELLULAIRES LIBÉRÉES PAR DES CELLULES  
MUSCULAIRES PRIMAIRES HUMAINES PROVENANT D'INDIVIDUS SAINS  
ET LES PERSONNES ATTEINTES DE DIABÈTE DE TYPE 2**

Assi Yapi

Thèse soumise à l'Université d'Ottawa dans le cadre des exigences du programme de maîtrise  
ès sciences Biochimie

Directrice de thèse : Dr. Céline Aguer

Département de Biochimie, Microbiologie et Immunologie

Faculté de Médecine

Université d'Ottawa

© Assi Yapi, Ottawa, Canada, 2025

## RÉSUMÉ

Les vésicules extracellulaires (VEs) sont des structures nanométriques sécrétées par les cellules, jouant un rôle important dans la communication intercellulaire. Les cellules musculaires, en tant que cellules métaboliquement actives, constituent une source pertinente pour étudier les VEs dans des conditions pathologiques. L'objectif général de cette étude était d'identifier les caractéristiques morphologiques et biochimiques des VEs libérées par des cellules musculaires primaires humaines issues de patients atteints de diabète de type 2 (DT2), et de les comparer à celles dérivées de sujets en santé. Les objectifs spécifiques incluaient la comparaison de plusieurs méthodes d'isolement (ultracentrifugation, ExoQuick, ExoEasy, EasySep), la caractérisation des VEs (taille, concentration, contenu protéique) et l'analyse comparative du contenu protéique des VEs issues de cellules musculaires primaires provenant de patients avec DT2 et de sujets en santé. Les VEs ont été isolées à partir du milieu conditionné de cellules musculaires humaines différenciées et caractérisées par analyse NTA (Nanoparticle Tracking Analysis), par dosage des protéines totales, et par Western blot pour les marqueurs vésiculaires TSG101, CD63, CD81. Parmi les méthodes d'isolement testées, ExoQuick et EasySep se sont révélés être plus performants en termes de rendement et de pureté avec respectivement  $4,2 \cdot 10^{10}$  particules/mL et  $4,3 \cdot 10^{13}$  particules/mL et une absence de calnexine dans les isolats. La caractérisation morphologique de taille a donné des diamètres de vésicules attendus avec une moyenne d'environ 75 nm pour l'ensemble des isolats. Au niveau du contenu, l'expression des marqueurs protéiques était variable d'une technique à l'autre, ne nous permettant pas d'établir une comparaison significative entre les conditions contrôles et DT2. Au niveau de la protéomique, de nombreuses protéines ont été identifiées dans les isolats de VEs issues de la technique EasySep. La tétraspanine CD81 a été solidement identifiée dans l'ensemble des isolats et avec plus une forte expression dans les cellules DT2. L'ensemble de nos données confirme l'identification de VEs dérivées de cellules musculaires primaires humaines à travers les caractérisations physiques et l'expression de marqueurs spécifiques aux VEs. Cependant les comparaisons intervésiculaires entre cellules musculaires de sujets en santé et de patients DT2 nécessitera des études plus poussées avec des techniques d'isolement solides et stables de manière à entrevoir une étude fonctionnelle des VEs dérivées de cellules musculaire dans le contexte du DT2.

## ABSTRACT

Extracellular vesicles (EVs) are nanoscale structures secreted by cells, playing a key role in intercellular communication. Skeletal muscle cells, as metabolically active cells, represent a relevant source to investigate EV dynamics under pathological conditions. The main objective of this study was to identify and compare the morphological and biochemical characteristics of EVs released by human primary skeletal muscle cells from patients with type 2 diabetes (T2D) and healthy donors. Specific objectives included: comparing several EV isolation methods (ultracentrifugation, ExoQuick, ExoEasy, and EasySep), characterizing the physical and protein properties of EVs, and analyzing differences in protein content between EVs isolated from muscle cells of T2D versus healthy individuals. EVs were isolated from the conditioned medium of differentiated human muscle cells and characterized using Nanoparticle Tracking Analysis (NTA), total protein quantification, and Western blotting for canonical EV markers (TSG101, CD63, and CD81). Among the isolation methods tested, ExoQuick and EasySep proved to be more efficient in terms of yield and purity with respectively  $4.2 \cdot 10^{10}$  particles/mL and  $4.3 \cdot 10^{13}$  particles/mL with an absence of calnexin in the isolates. The morphological size characterization gave expected vesicle diameters with an average of about 75 nm for all isolates. The expression of protein markers was very variable from one technique to another, not allowing us to establish a significant comparison between the healthy conditions and T2D. At the level of proteomics, many proteins have been identified in EV isolates from the EasySep technique. The tetraspanin CD81 has been solidly identified in all isolates and with a higher expression in T2D cells. All our data confirms the identification of EVs derived from human primary muscle cells through physical characterizations and expression of EV-specific markers. However, intervesicular comparisons between muscle cells of healthy subjects and T2D patients will require further studies with solid and stable isolation techniques to foresee a functional study of EVs derived from muscle cells within the framework of T2D.

## REMERCIEMENTS

Avant tout propos, je tiens à remercier tous les organismes qui ont contribué à financer cette étude : Le Fond France Canada pour la Recherche (FFCR) et Les Instituts de Recherche en santé du Canada (IRSC).

Un grand merci aux membres de mon comité de thèse, les Professeurs Derrick Gibbins qui a permis que je fasse certaines expériences dans son laboratoire et Lagacé Thomas pour leurs conseils et disponibilité tout long de ma maîtrise ainsi que le Dr. Aymeric Ravel-Chapuis, pour l'honneur que vous m'avez fait en acceptant d'être membre de mon jury de thèse.

Je remercie du fond du cœur ma directrice de thèse, la Dre Céline Aguer pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser un projet de recherche sur ce sujet aussi passionnant que complexe qui est l'étude des vésicules extracellulaires. Céline, je ne te remercierai jamais assez pour ta patience, ta disponibilité quasi illimitée et toute l'énergie que tu as consacrée à ces travaux et à la correction de ce manuscrit. Rien de tout cela n'aurait pu être réalisé sans ta bienveillance et ton soutien et pour ça, je t'en suis très reconnaissant.

Je tiens également à remercier les membres du laboratoire, la Dre Léa Garneau et la candidate au doctorat Hannah Khouri. Merci infiniment à vous deux pour vos encouragements, votre disponibilité en tout temps à m'aider dans les expériences. À Christine Compas et Mélodie Potvin, les jumelles des essais cliniques, un énorme merci pour tous les moments agréables partagés dans la bonne humeur chaque jour, rendant le travail de laboratoire moins monotone et plus enthousiasmant.

Je voudrais terminer ces remerciements avec les miens : Yann-Yvann, Axel, Paul Emmanuel et David pour vos sourires qui m'ont servi de carburant et à toi Zalirha, ma seconde moitié, qui a été présente depuis le début de cette aventure à m'épauler, me reconforter et m'encourager dans mes moments des doutes et de lassitudes. Tu m'as accompagné quotidiennement pendant ces quatre années de cette maîtrise, merci pour tout.

## TABLE DES MATIERES

I. Introduction .....	1
A. Diabète.....	1
1. Prévalence du diabète .....	1
2. Définition du diabète.....	2
3. Rôle physiologique de l'insuline .....	3
4. Physiopathologie du DT2 .....	4
5. Importance du muscle squelettique dans le DT2.....	6
a) Voie de l'insuline dans le muscle et perturbation lors de la résistance à l'insuline ...	7
(1) Inflammation musculaire.....	8
(2) Stress oxydatif .....	10
(3) Dysfonction mitochondriale musculaire.....	11
B. Vésicules extracellulaires.....	12
1. Contexte historique.....	12
2. Nomenclature et classification .....	15
3. Biogénèse de VEs .....	17
a) Exosomes.....	18
b) Microvésicules.....	20
c) Corps apoptotiques.....	21
4. Mécanisme moléculaire de libération des VEs par la cellule .....	22
5. Composition des VEs .....	25
a) Composition des exosomes .....	25
b) Composition des microvésicules .....	29
6. Méthodes d'études des VEs .....	30
a) Méthodes d'isolement .....	30
(1) Ultracentrifugation différentielle .....	31
(2) Immunoprécipitation magnétique.....	32
(3) Précipitation induite par le polyéthylène glycol (PEG) .....	32
(4) Précipitation induite par affinité membranaire.....	33
b) Méthodes de caractérisation.....	34

(1) Analyse physique.....	34
(a) Suivi individuel des particules par NTA (Nanoparticule Tracking Analysis) .....	34
(b) Diffusion de lumière dynamique ou « Dynamic Light Scattering ».....	35
(c) Microscopie électronique (MET) .....	35
(d) La cytométrie de flux.....	36
(2) Analyse biochimique .....	36
(a) Le Western blot.....	36
(b) La protéomique.....	37
7. Mode de communication des VEs .....	37
8. VEs et muscle squelettique .....	39
a) Rôle des VEs d'origine musculaires sur la différenciation musculaire.....	39
b) Rôle des VEs musculaires sur les adaptations du muscle et d'autres organes à l'exercice physique .....	41
c) Rôle des VEs dans le développement du DT2 et de la résistance à l'insuline .....	42
(1) <i>Rôle des VEs dérivées du tissu adipeux dans le développement de la résistance à l'insuline et du DT2.....</i>	43
(2) <i>Rôle des VEs circulant ou produites par d'autres tissus dans le développement de la résistance à l'insuline musculaire .....</i>	44
(3) <i>Rôle des VEs produites par le muscle dans le développement de la résistance à l'insuline et le DT2 .....</i>	45
II. Problématique et objectif de l'étude.....	46
III. : Méthodologie .....	48
A. Caractéristiques des participants.....	48
B. Culture cellulaire .....	48
C. Isolément des VEs .....	50
1. Ultracentrifugation différentielle .....	50
2. Méthodes de précipitation .....	50
a) Précipitation induite par le polyéthylène glycol (PEG).....	50
b) Précipitation induite par affinité membranaire .....	51
c) Immunoprécipitation magnétique .....	51

D.	Caractérisation des VEs .....	52
1.	Test du NTA (Nanoparticle Tracking Analysis).....	52
2.	Quantification des protéines et Immuno Blot .....	52
3.	Protéomique .....	54
IV.	: Résultats.....	56
A.	Caractérisation physique : comparaison du rendement en protéines et en particules des VEs selon différentes méthodes d'isolement .....	56
B.	Évaluation du rendement et des caractéristiques physiques des VEs isolées de cellules musculaires .....	58
C.	Analyse des VEs libérées par des cellules musculaires provenant de donneurs en santé et de patients atteints de diabète de type 2 (DT2) .....	61
1.	Analyse par NTA des VEs.....	61
2.	Comparaison du rendement protéique des VEs .....	61
3.	Analyse par Western blot des marqueurs vésiculaires .....	63
4.	Protéomique .....	65
V.	: Discussion .....	68
A.	Comparaison des différentes méthodes d'isolement des VEs .....	68
B.	Caractérisation des VEs isolées de cellules musculaires primaires humaines issues de patientes avec DT2 en comparaison à celles issues de sujets sains.....	71
C.	Limites de l'étude.....	76
VI.	: Conclusion .....	77
	BIBLIOGRAPHIE.....	78

## Liste des abréviations

<b>ACP</b>	Analyse en Composantes Principales	<b>GFP</b>	<i>Green Fluorescent Protein</i>
<b>ADN</b>	Acide Désoxyribonucléique	<b>GLUT4</b>	<i>Glucose Transporter Type 4</i>
<b>ADP</b>	Adenosine Diphosphate	<b>GSK3</b>	<i>Glycogen Synthase Kinase 3</i>
<b>ALIX</b>	<i>ALG-2-Interacting Protein X</i>	<b>HOMA</b>	<i>Homeostasis Model Assessment</i>
<b>ANXA2</b>	<i>Annexin 2</i>	<b>HRP</b>	<i>Peroxydase de Raiford</i>
<b>ARF6</b>	<i>ADP-Ribosylation Factor 6</i>	<b>HSP70</b>	<i>Heat Shock Protein 70</i>
<b>ARN</b>	Acide Ribonucléique	<b>HSP90</b>	<i>Heat Shock Protein 90</i>
<b>ARRDC1</b>	<i>Arestin Domain Containing Protein1</i>	<b>ICAM</b>	<i>Intercellular Adhesion Molecule</i>
<b>ATP</b>	Adénosine triphosphate	<b>IFN</b>	Interferons
<b>CANX</b>	<i>Calnexin</i>	<b>IKK</b>	<i>Kinase de l'inhibiteur NF-<math>\kappa</math>B</i>
<b>CD63</b>	<i>Cluster of Differentiation 63</i>	<b>IL6</b>	Interleukine 6
<b>CD81</b>	<i>Cluster of Differentiation 81</i>	<b>ILV</b>	Intraluminal Vesicle
<b>CD82</b>	<i>Cluster of Differentiation 82</i>	<b>IM</b>	Intramusculaire
<b>CD9</b>	<i>Cluster of Differentiation 9</i>	<b>IPAQ</b>	<i>International Physical Activity Questionnaire</i>
<b>CHMP4</b>	<i>Charged Multivesicular Body Protein 4</i>	<b>IR</b>	<i>Insulin Resistance</i>
<b>CMH1</b>	Complexe Majeur d'Histocompatibilité 1	<b>IRS</b>	Substrat du récepteur à l'insuline
<b>CMH2</b>	Complexe Majeur d'Histocompatibilité 2	<b>ISEV</b>	Société Internationale des Vésicules Extracellulaire
<b>CMV</b>	Corps Multivésiculaire	<b>LAMP1</b>	Lysosome-Associated Membrane Protein 1
<b>COX</b>	<i>Cycho-oxygénase</i>	<b>LPS</b>	Lipopolysaccharide
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium	<b>LT4</b>	Levothyroxine
<b>DT2</b>	Diabète de type 2	<b>LTA4</b>	Leukotriene A <sub>4</sub>
<b>DTT</b>	Dithiothreitol	<b>LTB4</b>	Leukotriene B <sub>4</sub>
<b>ECL</b>	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>	<b>LTC4</b>	Leukotriene C <sub>4</sub>
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>	<b>MET</b>	Microscope Electronique à transmission
<b>EPS</b>	Stimulation par Pulsation Electrique	<b>MISEV</b>	<i>Minimal Information for Studies of Extracellular Vesicles</i>
<b>ERK</b>	<i>Extracellular signal-Regulated kinase</i>	<b>MLCK</b>	<i>Myosin Light Chain Kinase</i>
<b>ESCRT</b>	<i>Endosomal Sorting Complex Required for transport</i>	<b>MVE</b>	<i>Endosome Multivesiculaire</i>
<b>FAS</b>	<i>Fatty Acid Synthase</i>	<b>NADH</b>	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide</i>
<b>FBS</b>	<i>Fetal Bovine Serum</i>	<b>NTA</b>	<i>Nanoparticle Tracking Analysis</i>
<b>FDR</b>	<i>False Discovery Rate</i>	<b>PBS</b>	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
<b>FFCR</b>	Fond France-Canada de Recherche	<b>PDCD</b>	<i>Programmed Cell Death</i>
<b>FLOT</b>	Flotilline	<b>PDK1</b>	Protéine kinase 1 dépendante des phosphoinositides
<b>FOXO1</b>	<i>Forkhead box 1</i>	<b>PEG</b>	<i>Polyéthylène Glycol</i>
<b>GAPDH</b>	<i>Glyceraldehyde-3-Phosphate Déshydrogénase</i>	<b>PGC-1<math>\alpha</math></b>	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>
<b>GDP</b>	<i>Guanosine Diphosphate</i>	<b>PGE<sub>2</sub></b>	Prostaglandine E <sub>2</sub>
<b>PI3K</b>	Phosphoinositide 3-kinase		

<b>PIP2</b>	Phosphatidylinositol -4,5-bisphosphate
<b>PIP3</b>	Phosphatidylinositol -3,4,5-bisphosphate
<b>PSAP</b>	Prosaposine
<b>PVDF</b>	Polyvinylidene Fluorure
<b>RAB</b>	<i>Ras-related in Brain</i>
<b>RIPA</b>	<i>Radioimmunoprecipitation Assay</i>
<b>ROS</b>	Espèces Reactives de l'Oxygène
<b>SDS</b>	Dodecylsulfate de sodium
<b>SIRT1</b>	Sirtuin 1
<b>SNAP</b>	<i>Soluble NSF Attachment Protein</i>
<b>SNARE</b>	Récepteur de la protein d'Attachement au NSF
<b>SOCS3</b>	<i>Suppressor of Cytokine Signaling 3</i>
<b>SOD2</b>	Superoxide Dismutase 2
<b>STAT3</b>	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i>
<b>TBST</b>	<i>Tris-Buffered Saline with Tween 20</i>
<b>TLR</b>	<i>Toll-Like Receptor</i>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Facteur de Necrose Tumorale alpha
<b>TOM20</b>	Translocase de la membrane externe mitochondriale 20
<b>TSG101</b>	<i>Tumor Susceptibility Gene 101</i>
<b>XBP</b>	<i>Exosome Binding Plate Buffer</i>
<b>XE</b>	<i>Exosome Elution Buffer</i>
<b>XWP</b>	<i>Exosome Washer Plate Buffer</i>

# I. Introduction

---

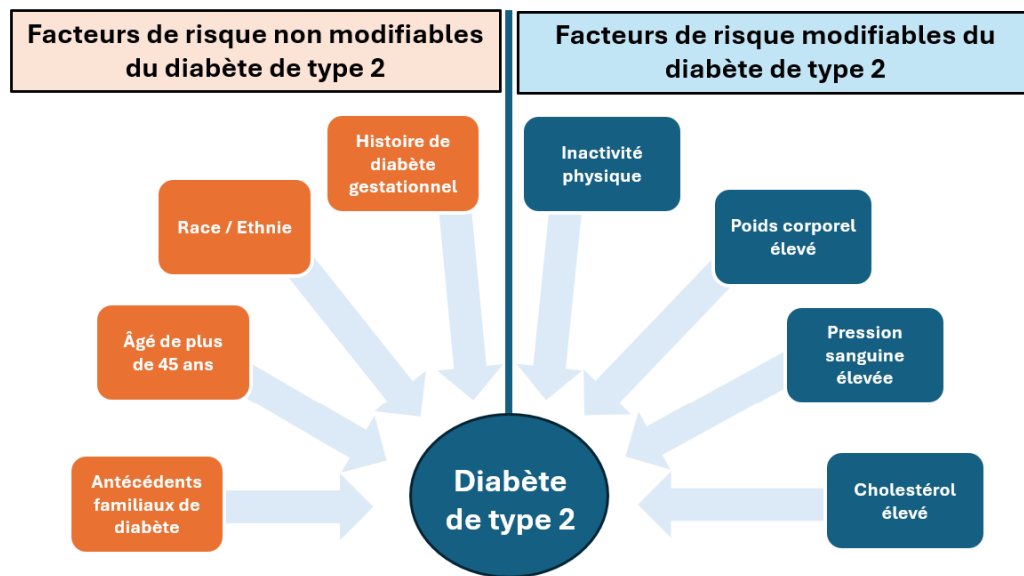
## A. Diabète

### 1. Prévalence du diabète

De 1990 à 2022 le nombre d'individus atteints de diabète est passé de 200 millions à 830 millions. Cette hausse de la prévalence mondiale du diabète est plus marquée dans les pays à revenu faible ou modeste comparativement aux pays à revenu élevé (1). Dans cette même période, la prévalence des personnes âgées de 18 ans atteintes de diabète est passée de 7% à 14%. De plus 59% des personnes atteintes de diabète âgées de plus de 30 ans n'avaient pas de traitement administré en 2022 (1). Au Canada, 5 à 10% des cas de diabète étaient de type 1, alors que 90 à 95 % représentaient un diabète de type 2 (DT2) (2). En 2021, la prévalence du diabète augmentait avec l'âge, chez les personnes âgées de 1 an et plus, 9,4% soit 3,7 million de personnes (10,1% d'hommes contre 8,7% de femmes) vivaient avec un diabète diagnostiqué (3). Entre 2007 et 2019, on considère que 1,9% d'adultes ayant un âge compris entre 20 et 79 ans avait un diabète non diagnostiqué et que 6,3% de ces mêmes adultes avaient un prédiabète (4). Un diagnostic et une prise en charge rapide permettent un meilleur suivi et une réduction des risques de complications, à savoir les maladies cardiovasculaires, les pathologies oculaires ou rénales, l'acidocétose diabétique et les ulcères du pied pouvant entraîner des amputations (5).

Le diabète de type 1 est un diabète qui ne peut être évité. Les facteurs de risque tels que les facteurs génétiques ne sont pas bien compris (6). Par contre, pour le DT2, certains facteurs de

risque (**Figure 1**) peuvent être modifiables comme l'adoption d'un mode de vie sain (activité physique régulière, alimentation saine, gestion du poids,...) et contribuer à une prévention efficace ou retarder significativement le développement du DT2 et ses complications (7).



**Figure 1. Facteurs de risques du DT2.** Les facteurs de risque modifiables et non modifiables du DT2.

## 2. Définition du diabète

Le diabète est une pathologie chronique caractérisée par l'insuffisance de production d'insuline par les cellules  $\beta$  du pancréas ou par l'incapacité des tissus insulinosensibles à utiliser efficacement l'insuline produite (8). Il existe deux principaux types de diabète : le diabète de type 1 et le DT2. Le diabète de type 1 est une maladie auto-immune caractérisée par un dysfonctionnement et la mort des cellules  $\beta$  du pancréas, entraînant une incapacité de celles-ci à fournir l'insuline à l'organisme. Le manque d'insuline va entraîner un blocage de l'absorption du glucose dans les tissus périphériques, notamment le muscle squelettique et le tissu adipeux, ce qui maintient des taux élevés de glucose sanguin (9). Dans le DT2, les cellules  $\beta$  produisent

de l'insuline, cependant les tissus périphériques sont défectueux et sont incapables d'utiliser l'insuline produite, une hyperglycémie s'installe et provoque une demande continue d'insuline conduisant à une signalisation dérégulée. Suite à cet état, on a un dysfonctionnement des cellules  $\beta$  et une sécrétion défectueuse d'insuline (9). Il existe d'autres types de diabète comme le diabète gestationnel, qui peut survenir chez les femmes enceintes sans antécédant de diabète et le diabète secondaire à certaines maladies ou conditions de santé (maladies pancréatiques, endocriniennes, les syndromes génétiques ou encore des infections virales) (9). Le diabète est diagnostiqué (**Tableau 1**) lorsque la glycémie à jeun est  $\geq 7,0$  mmol/L (126 mg/dL), que la glycémie est  $\geq 11,1$  mmol/L (200 mg/dL) après un test oral de tolérance au glucose, ou que l'hémoglobine glyquée est  $\geq 48$  mmol/mol ( $\geq 6,5$  %) (10).

**Tableau 1. Critères de diagnostic du diabète définis par l'OMS (2006).**

1	Glucose mesuré à jeun* $\geq 126$ mg/dL (7,0 mmol/L). *à jeun pendant au moins 8 h.
Ou	
2	Symptômes d'hyperglycémie : glucose mesuré après le dernier repas $\geq 200$ mg/dL (11.1 mmol/L). Présence de polyurie, polydipsie et perte de poids inexpliquée.
Ou	
3	Test hyperglycémie 2 heures après ingestion de 75 g de glucose (dissous dans l'eau) $\geq 200$ mg/dL (11,1 mmol/L)
Ou	
4	$HbA_{1c} \geq 6,5\%$

### 3. Rôle physiologique de l'insuline

L'insuline est une hormone peptidique endocrine qui se lie aux récepteurs intégrés à la membrane plasmique dans les cellules cibles pour engendrer une réponse anabolique selon la

disponibilité des nutriments (11). Le rôle de l'insuline dans l'homéostasie du glucose se traduit par les effets directs de celle-ci sur le muscle squelettique, le foie et le tissu adipeux. Ces tissus ont un rôle différent dans le métabolisme glucidique, ce qui nécessite des voies de transduction du signal insulinique spécifiques aux tissus (11). Ainsi, dans le muscle squelettique, l'insuline favorise l'utilisation et le stockage du glucose en augmentant le transport du glucose et la synthèse nette du glycogène. Dans le foie, l'insuline active la synthèse du glycogène, augmente l'expression des gènes de la lipogenèse et diminue l'expression des gènes de la néoglucogenèse. Enfin, dans le tissu adipeux blanc, l'insuline supprime la lipolyse et augmente le transport du glucose et la lipogenèse (11).

#### 4. Physiopathologie du DT2

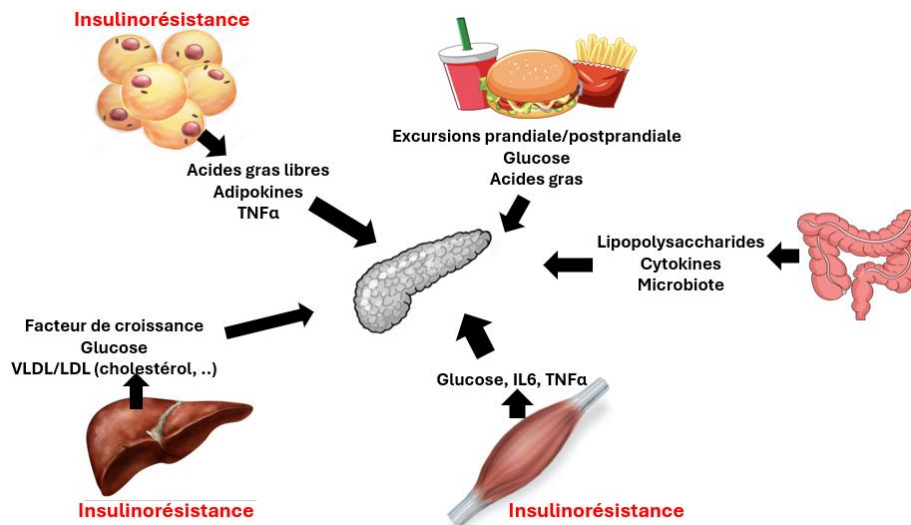
Le DT2 est la forme la plus répandue du diabète et représente près de 90% de l'ensemble des formes diagnostiquées. L'étiologie de la maladie implique à la fois des facteurs génétiques et environnementaux. L'obésité est l'un des facteurs de risque les plus importants du DT2, ainsi que l'âge. Le DT2 surviendrait suite à une production insuffisante en insuline due à une demande accrue de l'organisme en insuline causée par une augmentation de la résistance à l'insuline de tissus cibles tels que le muscle squelettique, le foie et le tissu adipeux (12). La perte relative ou absolue de la sensibilité de l'insuline précède le dysfonctionnement des cellules bêta du pancréas. Ce défaut fonctionnel semble être accompagné par la suite par une réduction de la masse totale des cellules bêta, ce qui favoriserait le développement de la maladie (13). La réduction de 65% de la masse totale des cellules pancréatiques est associée au DT2. Cette réduction s'expliquerait principalement par une augmentation de la mort des cellules bêta par apoptose, possiblement liée à une non-dédifférenciation de ces cellules (13,14). Une baisse de

prolifération et de néo-genèse semble aussi contribuer à la perte de masse des cellules bêta (15). Le dysfonctionnement des cellules bêta pancréatiques pourrait avoir une origine génétique. En effet, le facteur héréditaire du diabète est estimé à plus de 40%. Plusieurs gènes de susceptibilité du DT2 ont été découverts à travers de nombreuses études pangénomiques. La majorité des gènes de susceptibilité ont un rôle important dans la sécrétion de l'insuline et la survie des cellules bêta (16).

L'apport lipidique excessif et la résistance à l'insuline systémique associée à l'obésité auraient un rôle majeur dans la baisse de la masse et de la fonction des cellules bêta du pancréas (17) (**Figure 2**). L'inflammation chronique de bas grade, induite par une hyperlipidémie, accélère la résistance à l'insuline et la fonction diabétogène de l'obésité (18). Une exposition chronique des tissus insulinosensibles aux cytokines pro-inflammatoires conduit à une résistance à l'insuline (19). De même, les cellules bêta du pancréas exposées de manière chronique aux cytokines pro-inflammatoires montrent une diminution de la sécrétion de l'insuline en réponse au glucose et meurent par apoptose (20). L'inflammation chronique pourrait aussi être induite par une hausse de la perméabilité intestinale et une modification de la composition du microbiote qui sont observées chez les sujets atteints d'obésité présentant un DT2 (21). Cette hypothèse est renforcée par le fait que la sensibilité à l'insuline est améliorée chez les sujets vivant avec l'obésité chez qui il a été introduit une flore intestinale de donneurs minces (22).

Les mécanismes intracellulaires à travers lesquels l'obésité induit le dysfonctionnement des cellules bêta du pancréas ne sont pas totalement élucidés. Avec l'activation du stress du réticulum endoplasmique qui induit une baisse de la capacité des cellules bêta à produire de l'insuline et qui active aussi l'apoptose (23), il a été observé une altération de l'expression de gènes clés du fonctionnement et de la survie des cellules bêta du pancréas par des mécanismes

épigénétiques (24). Cette modification de l'expression des gènes semble être la conséquence de changement dans la méthylation de l'ADN, décrites dans les études pangénomiques du méthylome de l'ADN et dans des analyses systématiques de l'expression des gènes réalisées à partir des ilots de Langerhans de patients atteints de DT2 (24).



**Figure 2. Altération des cellules bêta pancréatiques dans le DT2.** Les fluctuations glycémiques postprandiales, associées à la production d'acides gras libres, de cytokines, d'adipokines, de cholestérol et de facteurs de croissance par les tissus insulinosensibles et l'intestin hyperperméable, altèrent la fonction et la survie des cellules bêta pancréatiques.

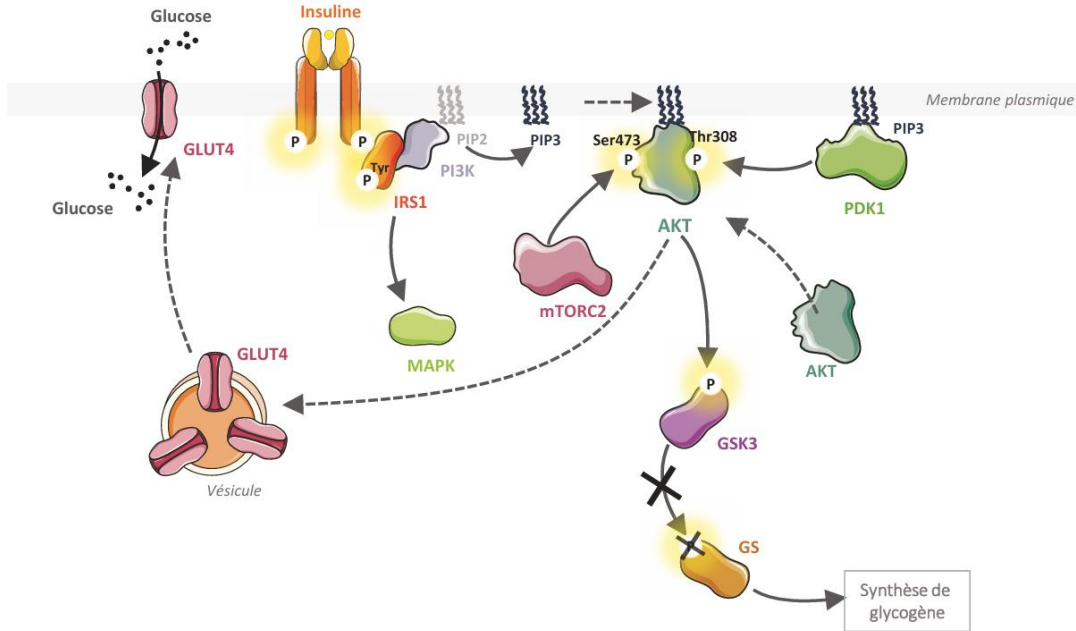
## 5. Importance du muscle squelettique dans le DT2

Au cours du DT2, les tissus insulinosensibles (le muscle squelettique, le foie et le tissu adipeux) perdent leur capacité de réponse à l'insuline. Le muscle squelettique représente environ 40% du poids du corps humain chez une personne de poids santé et joue un rôle essentiel dans la thermorégulation et le métabolisme du corps entier. Considérant que le muscle squelettique

capte 88% du glucose en réponse à l'insuline (c'est-à-dire en période postprandiale) (25), celui-ci joue un rôle majeur dans l'établissement de l'insulinorésistance périphérique. De nombreuses études ont d'ailleurs mis en évidence, dans des modèles murins, que la résistance à l'insuline au niveau du muscle contribuait de manière significative à l'altération de l'homéostasie glucidique (26,27). Il est difficile de démontrer des liens de causalité chez l'humain, mais des associations entre la résistance à l'insuline musculaire et le DT2 ont été confirmées. En effet, une étude a comparé des sujets normoglycémiques avec (HF+) et sans (HF-) historique familiale de DT2, et les résultats ont montré que les individus (HF+), à risque de développer un DT2, avaient une réduction significative de la phosphorylation sur la tyrosine du substrat du récepteur à l'insuline (IRS-1) et une diminution de l'activité de la phosphoinositide-3-kinase (PI3 kinase) associée à IRS-1 dans le muscle squelettique (28), montrant que des perturbations de la voie de l'insuline au niveau musculaire sont présentes avant le développement du DT2.

*a) Voie de l'insuline dans le muscle et perturbation lors de la résistance à l'insuline*

L'insuline régule de nombreux processus biologiques à travers son action sur son récepteur tyrosine kinase qui lorsque phosphorylé génère une cascade de signalisation conduisant à la régulation du métabolisme et la croissance cellulaire. Elle induit aussi plusieurs autres voies métaboliques dans les différents tissus cibles. La figure 3 montre la cascade de signalisation de l'insuline, avec les protéines clés de la voie de signalisation de l'insuline qui sont : le complexe du récepteur de l'insuline et son substrat (IRS), Akt, la glycogène synthase (GS) et le transporteur de glucose 4 (GLUT4).



**Figure 3. Voie de signalisation de l'insuline dans le muscle squelettique.** La fixation de l'insuline sur son récepteur induit une auto-transphosphorylation de ce dernier via son activité tyrosine kinase. La présence de domaines phosphorylés sur le récepteur de l'insuline permet le recrutement du substrat du récepteur à l'insuline 1 (IRS1) qui est à son tour phosphorylé par le récepteur de l'insuline sur ses résidus tyrosine. Cela permet le recrutement de la phosphoinositide-3-kinase (PI3K) qui métabolise la phosphatidyl-inositol-diphosphate (PIP2) en phosphatidyl-inositol-triphosphate (PIP3). PIP3 se fixe ensuite au domaine d'homologie d'Akt (ou protéine kinase B (PKB)) et permet son recrutement à la membrane plasmique. Akt est ensuite phosphorylée par mTORC2 sur son résidu serine 473 (Ser473) et par la phosphoinositide-dépendent kinase 1 (PDK1) sur son résidu thréonine 308 (Thr308). Akt relaie l'action de l'insuline en induisant de manière indirecte la translocation à la membrane plasmique des vésicules contenant GLUT4, permettant ainsi la captation du glucose. Akt activée va phosphoryler la glycogène synthase kinase 3 (GSK3), ce qui la rend inactive et l'empêche de phosphoryler la glycogène synthase (GS) qui peut alors synthétiser du glycogène à partir du glucose.

(1) Inflammation musculaire

L'inflammation est un processus qui provoque une augmentation des cellules immunitaires et une augmentation des quantités de cytokines pro-inflammatoires dans le sang et dans les tissus (29). L'obésité est associée à une inflammation chronique de bas-grade qui est impliquée dans la survenue de nombreuses pathologies. Certaines cytokines comme l'interleukine 6 (IL-6) et le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF $\alpha$ ) sont des myokines pro-inflammatoires impliquées dans la phase aiguë de l'inflammation au niveau musculaire.

L'IL-6 joue un rôle complexe dans la régulation de la sensibilité à l'insuline au niveau du muscle squelettique. Alors qu'une élévation aiguë de l'IL-6, comme celle observée lors de l'exercice, contribue à l'amélioration de la captation du glucose (30), une exposition chronique à des niveaux élevés d'IL-6 induit une augmentation de l'inflammation et de la résistance à l'insuline au niveau musculaire (30). Par exemple, l'IL-6 stimule l'expression du gène SOCS3 (Suppressor of Cytokine Signaling 3) dans les myotubes humains. SOCS3 interfère avec la signalisation de l'insuline en se liant au récepteur de l'insuline et en empêchant la phosphorylation d'IRS-1, réduisant ainsi l'absorption du glucose (31).

D'autre part, l'expression de TNF- $\alpha$  est aussi augmentée dans le muscle des personnes vivant avec un DT2. Cette augmentation est encore plus prononcée dans les muscles des personnes avec à la fois un DT2 et une obésité, comparée à celle de sujets contrôles qu'ils soient atteints d'obésité ou non (32). TNF- $\alpha$  induit l'activation de serine/thréonine kinases comme la kinase N-terminal c-Jun (JNK) et la kinase régulée par signal extracellulaire (ERK)1 et 2, qui phosphorylent IRS-1 sur ses sérines inhibitrices au niveau des résidus sérine 307 (sérine 312 chez l'humain), 612, 632 (sérine 636 chez l'humain) (33). Ceci conduit à l'accumulation d'IRS-1 non fonctionnels, bloquant ainsi la signalisation insulinique (33).

De même que les cytokines pro-inflammatoires, les acides gras saturés peuvent exacerber l'inflammation présente dans les cellules musculaires. Ceci se déroule à travers 2 voies distinctes : une voie directe via leur interaction avec les récepteurs Toll-like (TLR), ou une voie indirecte via la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. En effet, les acides gras saturés sont capables d'interagir directement avec des récepteurs de la famille TLR. Les TLRs sont capables de reconnaître certains motifs spécifiques, notamment ceux provenant de lipides ancrés dans la membrane des agents pathogènes, comme les lipopolysaccharides (LPS). Au niveau du muscle, les acides gras saturés activent les récepteurs Toll-like 4 (TLR4) présents à la surface des cellules, conduisant ainsi à l'activation de JNK et du complexe inhibiteur du facteur nucléaire kb kinase (IKK) (34). Ces deux kinases de stress induisent ensuite la phosphorylation d'IRS-1 sur des résidus serine 307 et 632 (33), inhibant ainsi l'activité d'IRS-1 et le signal insulinique (34). De plus, ces kinases de stress induisent une augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$  et l'IL-6 (35).

## (2) Stress oxydatif

La production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) constitue aussi une perturbation majeure de la régulation du glucose dans le muscle squelettique. L'hyperglycémie serait une condition favorable au stress oxydant. En condition physiologique, le NADH produit lors de la glycolyse sert de donneur d'électrons à la chaîne respiratoire. Alors qu'en condition d'hyperglycémie, on assiste à une forte production de NADH, l'excès d'électrons qui ne peut être utilisé par la chaîne respiratoire est alors complexé à l'oxygène, aboutissant donc à la production de ROS (36). Les muscles de patients avec obésité contiennent plus de ROS que les muscles de patients minces

(37) et les systèmes antioxydants, comme les vitamines C, E et le glutathion sont diminués dans le plasma de patients atteints de DT2 (38).

### (3) Dysfonction mitochondriale musculaire

Le muscle squelettique est un tissu riche en mitochondries qui dépend de la phosphorylation oxydative pour produire de l'énergie (39). Le dysfonctionnement mitochondrial se définit comme étant une réduction du contenu mitochondrial, une réduction de l'activité mitochondriale ou encore des changements dans la production des ROS (40). En 2015, Antoun et al. ont démontré qu'il y avait une réduction des supercomplexes mitochondriaux dans le muscle squelettique des personnes atteintes de DT2 associée à une faible respiration mitochondriale (41). Les personnes vivant avec le DT2 ont une diminution du nombre de mitochondries, des mitochondries beaucoup plus petites, une altération de la fonction mitochondriale et de l'oxydation complète des acides gras (42). Cependant, il n'a pas été prouvé que la dysfonction mitochondriale induisait une résistance à l'insuline ou l'inverse. Les personnes présentant une résistance à l'insuline et un DT2 ont des niveaux réduits de PGC-1 $\alpha$  dans le muscle squelettique (43). Puisque PGC1 $\alpha$  est un facteur de transcription qui régule la biogenèse mitochondriale, ceci pourrait expliquer la diminution du nombre de mitochondries musculaires dans une condition de résistance à l'insuline. Il a été rapporté que les personnes présentant une résistance à l'insuline ou un DT2 présentaient des taux réduits de mitofusine 2 (Mfn2) et une fusion mitochondriale diminuée (44). Plusieurs études ont montré que le fonctionnement de la chaîne de transport des électrons et la consommation mitochondriale en oxygène sont diminuées dans le muscle des personnes vivant avec un DT2 (45) mais aussi chez des personnes en santé ayant une histoire

familiale de DT2 (46). Pris ensemble, ces études montrent que des déficiences mitochondriales sont courantes dans le muscle de patients avec insulino-résistance ou DT2.

## **B. Vésicules extracellulaires**

En plus des myokines et d'autres métabolites sécrétés, le muscle squelettique libère également des nanoparticules appelées vésicules extracellulaires (VEs) (47). Ces VEs sont délimitées par une bicouche lipidique, ne peuvent pas se répliquer car anucléées et sont détectées dans différents fluides corporels (48–52). Autrefois considérées comme des débris cellulaires, les VEs sont désormais reconnues comme des médiateurs alternatifs de la communication cellulaire, capables de transporter une large gamme de biomolécules telles que les protéines (les cytokines et les médiateurs inflammatoires), les acides nucléiques (miARN) et les lipides (48–53).

### **1. Contexte historique**

La découverte et la fonction possible des VEs ont été initialement suspectées en 1946 par Erwin Chargaff et Randolph West qui étudiaient la thromboplastine et les plaquettes (54). Ils ont émis l'hypothèse qu'en plus d'agents thromboplastiques, plusieurs minuscules produits de dégradation des globules sanguins contribuaient aux propriétés de coagulation (54). En 1967, Wolf et al. ont étudié et apporté de solides preuves démontrant que le matériel coagulant plasmatique découvert et supposé par Chargaff et West comme étant le produit de dégradation de globules sanguins, étaient en fait des particules minuscules d'origine plaquettaire, riche en lipides qu'ils ont alors appelé poussière plaquettaire (55). En 1971, Aaronson et son équipe ont

utilisé pour la première fois le terme « vésicules intracellulaires et extracellulaires » (56). Avec la microscopie électronique, ils ont donné la toute première preuve d'ultrastructure membranaire intra et extracellulaires dans une algue flagellée *O. danica*. Ils ont aussi décrit comment ces structures membranaires intactes pouvait être récupérées par centrifugation (56). Des études réalisées à la fin des années 1970, utilisant la microscopie électronique et la lyse chimique, précisément la technique de cavitation à l'azote, ont permis d'identifier, dans le sérum fœtal bovin (FBS), de nombreuses microvésicules allongées et sphériques, variant de 30 à 60 nm, avec une enveloppe membranaire trilamellaire. Il a été démontré ensuite que ces structures étaient soit des composants cellulaires normaux, soit des produits de dégradation de composants cellulaires normaux, qui étaient différents des virus. Ces structures ont été classées en « membranes plasmiques », en « membranes extracellulaires » et en « microvésicules » selon leur compartiment d'origine (57). D'autres études ultérieures ont confirmé qu'il ne s'agissait pas de particules virales ni de débris cellulaires, mais qu'il s'agissait bien d'entités biologiques dérivées de compartiments intra et extracellulaires (58). Cependant aucune information supplémentaire sur l'origine biologique, le contenu et la fonction des VEs n'a été donnée dans cette étude.

Le terme exosome, provenant de « exo »= extérieur et « soma »=corps, a été introduit dans les années 1970 en référence aux fragments d'ADN transférés entre les cellules (59–61). Mais, l'absence de liaison établie entre les fragments d'ADN et les bicouches lipidiques a empêché ces particules d'être considérées comme des vésicules extracellulaires. C'est seulement en 1981 que le terme « exosome » a été proposé par Trams et al. pour désigner une exfoliation de microvésicules de la membrane plasmique (62). Ce dernier et son équipe ont fortement contribué à des avancées importantes dans la connaissance et la compréhension de la genèse

et de la fonction de VEs. Spécifiquement, le fait que l'exfoliation des vésicules membranaires puisse se produire dans la majorité des cellules normales et néoplasiques différentes et aussi que le processus exfoliatif soit sélectif et sur la base de la composition lipidique, suggère fortement que les VEs sont constituées de domaines spécifiques de la membrane plasmique (62). Ainsi, en utilisant la microscopie électronique, deux sous populations de VEs ont été décrites : l'une constituée de vésicules de forme irrégulière et ayant un diamètre entre 500 et 1000 nm et une deuxième sous population de vésicules sphériques de diamètre plus petit d'environ 40 nm. Il s'agissait sûrement de la première description de ce qui, plus tard, allait être reconnu comme étant un corps multivésiculaire (MVB), source des exosomes.

Bien que les travaux de Trams et al. aient été cités à de nombreuses reprises dans les années 1980, le terme « exosome » n'a en réalité été réutilisé pour désigner les VEs que plus tard en 1986 (63) et en 1987 par Johnstone et al. qui ont décrit, chez les réticulocytes, une formation de structures multivésiculaires qui, après avoir fusionnées avec la membrane, libéraient dans le milieu extracellulaire les vésicules qu'elles contenaient (64). A partir de ce mécanisme, le réticulocyte pouvait se débarrasser des protéines et structures qui n'étaient plus nécessaire à sa maturation (65). Conséquemment à ces découvertes, ces auteurs ont été les premiers à signaler l'existence d'exosomes sous forme de vésicules intraluminales d'endosomes multivésiculaires secrétés lors de la fusion avec la membrane plasmique (66), définissant ainsi pour la première fois les différentes voies de biogenèses des exosomes et des microvésicules (67). Longtemps considérés comme moyens de convoyages de composants cellulaires désuètes par les réticulocytes, les exosomes sont restées peu étudiés pendant les 10 années suivant les découvertes de Trams, les chercheurs étant restés sceptiques quant à l'existence

réelle de cette voie de sécrétion des VEs et même convaincus que les exosomes n'étaient que des fragments de membranes relâchés artificiellement lors d'expérimentation in vitro.

Après leur découverte dans les réticulocytes, les structures MVB et les exosomes sont découverts dans plusieurs autres types de cellules, y compris les plaquettes (68) et les cellules épithéliales en 1991 (69), les lymphocytes B en 1996 (70), les cellules dendritiques en 1998 (71) et les neurones en 2005 (72). Un regain d'intérêt s'est emparé de la communauté scientifique dans le domaine de l'immunologie suite à ces découvertes et suite aux études montrant que le complexe MVB/exosomes semblait jouer un rôle important dans l'activation du système immunitaire et dans la stimulation des réponses immunitaires adaptatives (70,71). Ces études ont donc fourni des informations essentielles sur la biogenèse des vésicules (73).

Il existe maintenant un consensus sur la biogenèse des exosomes, à savoir avec bourgeonnement, fission et ségrégation qui se produisent dans la lumière du MVB, qui ne se produisent pas par défaut mais qui sont plutôt régulés par des processus très spécifiques. De plus, il a été démontré que la décharge d'exosomes se produit non seulement par exocytose constitutive mais aussi par exocytose régulée des MVB activés en réponse aux signaux intracellulaires spécifiques (74). Présentement, les VEs sont bien décrites chez les mammifères et semblent être impliquées dans plusieurs processus biologiques (75–78).

## 2. Nomenclature et classification

Les nouvelles méthodes de caractérisation des VEs (analyse de suivi des nanoparticules, cytométrie de flux à haute résolution, etc...), ainsi que les nombreuses publications engendrées par ces études, ont conduit à l'utilisation de plusieurs termes pour les nommer (73) : exosomes

ou microvésicules, mais aussi ectosomes ou particules membranaires et vésicules de type exosomes ou de type apoptotique. C'est György et al. en 2011 (79), dans le but d'aider à une meilleure clarté des terminologies utilisées pour nommer les VEs, qui suggèrent que l'ensemble des vésicules mobiles limitées par une membrane et contenues dans l'environnement extracellulaire devrait être appelé « vésicules extracellulaires » et non microparticules, parce que les particules suggèrent une structure solide et particulière plutôt qu'une structure vésiculaire. Les VEs incluraient donc les exosomes, les microparticules/microvésicules qui sont induites par activation ou apoptose et enfin les corps apoptotiques (79). Ils ont aussi proposé une classification des VEs en trois grandes classes : **exosomes** (40 à 100 nm de diamètre), **microvésicules** (100 à 1 000 nm de diamètre) et **corps apoptotiques** (> 1 µm de diamètre) en fonction de leur biogénèse, leur composante sécrétoire et de leur taille, dans le but d'avoir une terminologie sans ambiguïté (**Figure 4 & Tableau 2**). Malgré la suggestion de György en termes de terminologie et sa classification proposée, le terme exosome a été utilisé par la suite, et l'est encore aujourd'hui, de 3 manières différentes. Certains chercheurs les nomment suivant la définition biogénétique originale (c'est-à-dire des vésicules qui bourgeonnent en endosomes et sont relâchées lorsque les MVB résultants fusionnent avec la membrane plasmique) (64,70). D'autres préfèrent la définition large (c'est-à-dire des vésicules sécrétées qui peuvent remplir une fonction physiologique) (62,80). Enfin, d'autres utilisent une définition empirique basée sur la centrifugation différentielle (c'est-à-dire des vésicules qui sédimentent seulement après centrifugation soit à 70 000 – 100 000g ou à 10 000 – 20 000g) (64,81). Ainsi, dans le souci d'éviter toute confusion, la société internationale des vésicules extracellulaires (ISEV) recommande le terme générique VEs pour la désignation de toute particule relâchée par une cellule qui se caractérise par une bicouche lipidique et est anucléée (48). L'ISEV reconnaît que

les VEs sont produites par une grande majorité de types cellulaires en condition physiologique ou pathologique et jouent un rôle clé dans la communication intercellulaire (82–84). Les VEs peuvent donc être isolées de milieux conditionnés et de fluides biologiques tels que le sang, l'urine, la salive, etc... L'ISEV subdivise aussi les VEs en trois groupes comme définis plus haut (85). Aussi, Clothilde Théry et son équipe ont proposé une classification pouvant être appliquée quelle que soit l'origine des VEs. Elle différencie les VEs de taille inférieure à 200 nm, appelées « petites vésicules » (PVEs) et pouvant être isolées par ultracentrifugation (100 000 g), et les LVEs de tailles supérieures à 200 nm, appelées « larges vésicules», le plus souvent isolées par centrifugation (10 ou 20 000 g) (48).

### 3. Biogénèse de VEs

Toutes les cellules de l'organisme peuvent libérer des types distincts de VEs (86). La genèse des différents types de VEs est faite à des emplacements subcellulaires spécifiques et partagent des caractéristiques communes et/ou distinctes. Les nouvelles méthodes utilisées pour isoler les VEs démontrent une population des VEs assez hétérogène. Il est aussi important de noter que les méthodes actuelles utilisées pour isoler les VEs ne sont pas capables d'isoler des populations pures de chaque sous-type de VEs, surtout si une seule méthode est utilisée (87). Malgré cette limitation, la plupart des découvertes biologiques mettent en évidence que la communication intracellulaire n'est pas nécessairement induite par les exosomes seuls. Au-delà de l'isolement, le processus de biogénèse est également un processus complexe qui n'est pas encore complètement compris. Par exemple, la majorité des publications actuelles décrivent la biogénèse des exosomes et des microvésicules comme étant complètement différente ; les

microvésicules sont produites par bourgeonnement de la membrane plasmique, tandis que les exosomes sont formées par un processus d'endocytose, suivi d'une exocytose. Bien que plusieurs sources soutiennent cette distinction, il existe également des preuves suggérant que la biogénèse des exosomes pourrait se produire directement au niveau de la membrane plasmique (88,89).

a) *Exosomes*

Les exosomes sont des VEs avec une taille comprise entre 40 et 100 nm, relâchés par les cellules dans le milieu extracellulaire en condition basale ou pathologique. La biogénèse des exosomes est effectuée dans l'endosome tardif, ou CMV, qui est identifié comme un endosome formé à la suite d'une invagination de la membrane plasmique. Ainsi les CMV vont englober les protéines ou lipides étiquetés destinés, soit à être dégradés par le lysosome, soit à être acheminés vers une cellule cible après fusion avec la membrane plasmique. La libération du contenu des CMV sous forme de vésicules se fait dans le milieu extracellulaire et ces vésicules sont appelées exosomes (**Figure 4**) (90). La biogénèse des exosomes est caractérisée en deux grandes étapes. La première étape est caractérisée par la réorganisation de certaines protéines membranaires, les tetraspanines (CD9/81 et CD63), en microdomaine à la surface de la membrane de l'endosome conduisant à la formation des vésicules intraluminales (91,92). La seconde étape fait appel aux protéines du complexe ESCRT (Endosomal Sorting Complexes Required for Transport) : la reconnaissance et le recrutement des protéines ubiquitinylées par ESCRT-0 survient après la formation des vésicules intraluminales, ensuite ESCRT-0 recrute ESCRT1 (Tumor susceptibility gene 101 : TSG101) et ESCRT2 pour initier une invagination membranaire ayant pour but l'internalisation du contenu cytoplasmique. Puis, le recrutement

d'ESCRT3 (Alix) permet de compléter la formation de l'invagination puis la coupure des vésicules intraluminales de la membrane endosomale ainsi que leur stockage au sein des CMV (93–95).

Il existe deux autres voies de formation des exosomes, indépendantes du complexe ESCRT. L'une de ces voies se traduit par la conversion des sphingomyélines en céramides par les sphingomyélinases (96,97). Cette synthèse passe par le recrutement de microdomaines lipidiques en radeau participant à la séparation du contenu des exosomes dans la membrane endosomale (98). Elle requiert la formation de céramides, ce qui fait intervenir la neutral sphingomyélinase de type II (nSMASEII) permettant ainsi l'hydrolyse de la sphingomyéline en céramide (97). Les céramides permettent la formation de sous-domaines spécifiques, ce qui imposerait une courbure spontanée de la membrane (99). Par ailleurs, la céramide est métabolisée en sphingosine 1-phosphate, qui est capable d'activer son récepteur G inhibiteur associé, qui semble essentiel dans l'assortiment du cargo à l'intérieur des MVB (100). En effet, la voie de signalisation induite par le sphingosine-1-phosphate impacte fortement la production des MVB positifs pour CD63. Ce mécanisme souligne le rôle clé des céramides et de leurs métabolites dans la biogenèse exosomale (101). L'autre voie fait intervenir le complexe syndécan-synténine-ALIX (102). Des interactions existent entre la voie de formation classique ESCRT et d'autres protéines accessoires telles que la synténine ou la protéine ALIX, qui relie les cargos et la sous-unité de ESCRT-III (102). En interaction avec d'autres protéines du complexe ESCRT (TSG101 et CHMP4), ALIX participe au bourgeonnement et à la scission de la membrane endosomale ainsi qu'à la sélection du cargo en corrélation avec le complexe synténine-syndécan (103). Les syndécans sont des protéines membranaires qui interagissent avec une protéine cytosolique, la synténine, créant ainsi un complexe synténine-syndécan. Ce

complexe entre ensuite en liaison avec ALIX et la tétraspanine CD63 grâce à des domaines spécifiques Leucine-Tyrosine-Proline- $X^n$  (n acides aminés) -Leucine (LYPXnL). On observe en effet, par extinction des gènes de la synténine, une réduction des taux de protéines ALIX et CD63 et du nombre d'exosomes libérés (102). Ce mécanisme dépend par ailleurs de la présence de la GTPase ADP-ribosylation factor 6 liée à Ras (ARF6) (104).

Plusieurs études s'intéressent au contenu en biomolécules des exosomes. Ainsi, selon les bases de données cités plus haut, il y aurait 41 860 protéines, 7540 acides ribonucléiques (ARN) et 1116 lipides découverts selon plus de 286 études portant sur les exosomes (105,106).

#### b) *Microvésicules*

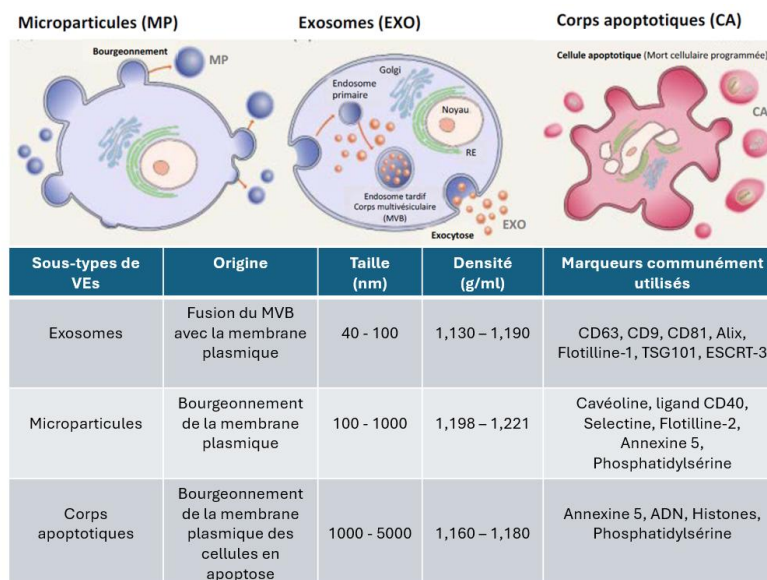
Les microvésicules, aussi connues sous les noms d'ectosomes ou d'encosomes, sont des particules de taille variant de 100 à 1000 nm et des moyens tout aussi important d'échanges intercellulaires. Bien que la compréhension de la biogenèse des microvésicules ne soit pas encore développée comme celle des exosomes, car moins étudiée, des études ont démontré que de petites protubérances cytoplasmiques sont générées à la membrane plasmique avant l'éjection, provoquant un pincement de la membrane par un événement de fission et la libération de la microvésicule (107,108). Ces protubérances semblent être distinctes et causées par des changements localisés dans la composition protéique et lipidique de la membrane plasmique qui favorise sa courbure et sa rigidité (109). Même si la biogenèse des microvésicules ne semble pas être associée à la voie endosomale, le processus de bourgeonnement nécessite une machinerie endosomale pour sa formation (110). Nabhan et ses collègues ont montré que les composantes du complexe ESCRT, en particulier TSG101, étaient capables de promouvoir la formation de microvésicules (111). Ils ont découvert que le bourgeonnement membranaire était

actionné par une interaction spécifique de TSG101 avec un motif proline-serine-alanine-proline (PSAP) tétra peptidique d'une protéine accessoire, la protéine 1 contenant un domaine d'arrestine (ARRDC1). Cette interaction provoquerait la relocalisation de TSG101 des endosomes vers la membrane plasmique, facilitant la libération de microvésicules contenant TSG101, ARRDC1 et d'autres protéines cellulaires. Une autre protéine associée à la voie endosomale qui semble être impliquée dans la formation des microvésicules est la GTPase ARF6 (112). L'ARF6 active la phospholipase D, conduisant à l'activation de la kinase régulée par le signal extracellulaire (ERK). Au niveau du cytosquelette, une fois activée, ERK phosphoryle et régule la chaîne légère de la myosine (MLCK), entraînant la libération de la microvésicule à la suite de la contraction de l'actomyosine du "cou" de la microvésicule. En plus des protéines connues pour jouer un rôle dans la promotion de la courbure membranaire, il existe des preuves suggérant que l'accumulation de nombreuses protéines au niveau de la membrane plasmique elle-même peut être suffisant pour induire la formation de microvésicules via la courbure membranaire. Par exemple, il a été démontré que de fortes concentrations de protéine fluorescente verte (GFP) à la surface de la membrane plasmique est capable de courber celle-ci (113,114).

### c) *Corps apoptotiques*

Les corps apoptotiques sont des vésicules de taille supérieure à 1  $\mu\text{m}$ , exclusivement libérées par les cellules en apoptose (115). Lors de la mort cellulaire autoprogrammée, la cellule subit d'importantes modifications telles que la condensation cytoplasmique et nucléaire, la fragmentation de l'ADN et surtout l'externalisation de la phosphatidylsérine conduisant au

bourgeoisement de la membrane plasmique dans plusieurs sens suivi de l'éclatement cellulaire et de la libération de larges vésicules appelées corps apoptotiques (**Figure 4**) (115,116).



**Figure 4 & Table 2. Biogenèse et caractéristiques physiques des VEs.** Représentation du mode de libération des différents types de VEs par les cellules de mammifères. Libération par bourgeoisement de la membrane plasmique pour les MP, par fusion des MVB avec la membrane plasmique pour les exosomes et par bourgeoisement de cellule lors de l'apoptose pour les corps apoptotiques (Adapté de (117,118)).

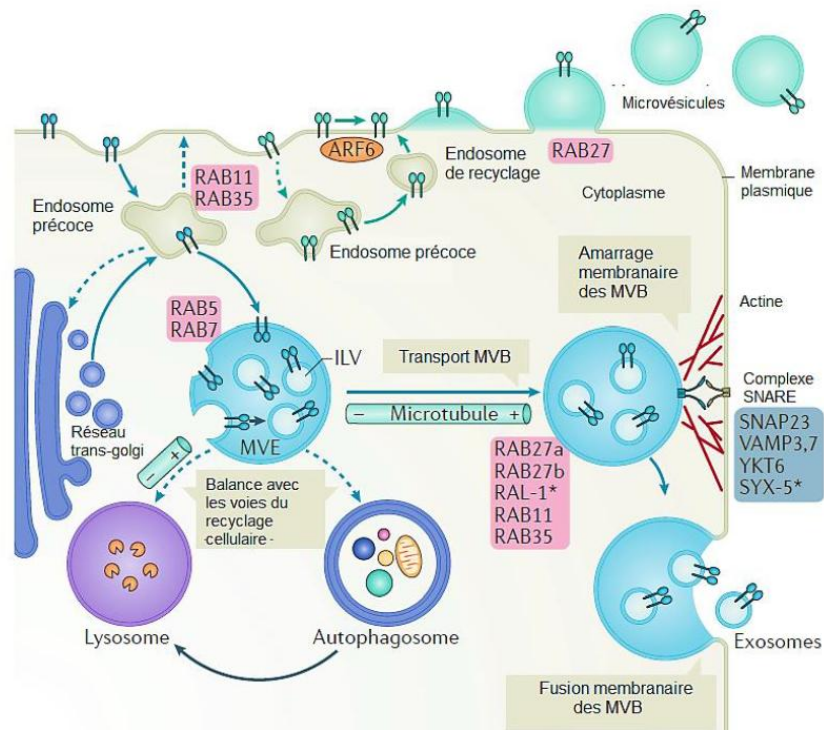
#### 4. Mécanisme moléculaire de libération des VEs par la cellule

Après la phase de biogénèse, les MVB sont acheminés jusqu'à la membrane plasmique et fusionnent avec elle pour relâcher les exosomes dans le milieu extracellulaire. Des études ont montré l'action de certaines protéines RAB dans le trafic intracellulaire vésiculaire (119) et que RAB27A et RAB27B, ainsi que leurs effecteurs, sont essentiels dans la sécrétion exosomale (120). RAB27B régule la motilité des MVB vers la membrane et les deux isoformes jouent un rôle majeur sur l'étape d'amarrage à la membrane. Il est connu que RAB27A implique un

réarrangement du cytosquelette d'actine sous-membranaire (121). Toutefois les isoformes de RAB27 ne sont pas distribuées de manière ubiquitaire, ce qui implique que chaque type cellulaire adapte potentiellement la machinerie impliquée. Une étude de Rocha (2009) a montré que l'adressage des MVB vers les lysosomes passe par un transport rétrograde sur les microtubules, transport initié par RAB7 qui permet le recrutement de dynéine. Pourtant RAB7 est aussi impliqué dans la sécrétion exosomale, puisque d'autres études rapportent une stimulation de l'excrétion des exosomes lorsque cette protéine est surexprimée (102). Cette double fonction paradoxale repose sur le statut ubiquitilé de RAB7, qui selon son état, serait à l'origine d'un recrutement de la machinerie destinant les MVB au recyclage ou à la sécrétion (122). Des protéines RAB, comme RAB11 et RAB35 interviennent aussi dans le transport des MVB (123,124). Les protéines RAB interviennent à de multiples niveaux comme on peut l'observer sur la **Figure 5**. Elles sont actrices du transport intracellulaire dès la formation des endosomes dans la cellule.

L'acheminement des MVB vers la membrane plasmique étant effectué, la fusion membranaire et la libération des exosomes font intervenir un autre complexe protéique, le complexe *Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein Receptor* ou SNARE. Cette famille de protéines est à l'origine des principaux mécanismes de trafic et de fusion membranaire dans les cellules eucaryotes (125). Les complexes sont généralement formés de 3 à 4 protéines regroupées en un complexe hélicoïdal sur la membrane plasmique. Ainsi un complexe est formé d'une R-SNARE (protéine vésiculaire) et trois Q-SNARE (protéine de la membrane cible) (126). Les R-SNARE comptent notamment les synaptobrévines (famille des *Vesicle Associated Membrane Protein* (VAMP)) alors que les Q-SNARE exosomales comptent les syntaxines et les protéines SNAP. Cet assemblage hélicoïdal est associé à une autre famille de protéines, les

synaptotagmines, qui modulent l'activation du signal de fusion membranaire. Le calcium intervient dans la régulation de la sécrétion de l'exosome en activant le changement de conformation du complexe et sa fusion (70,124). En effet, il a été montré que le complexe SNARE VAMP7/SNAP23/syntaxine-4/synaptotagmine VII est impliqué de manière fonctionnelle dans la fusion des lysosomes, par fixation du  $Ca^{2+}$  sur la synaptotagmine (127).



**Figure 5. Schéma récapitulatif des mécanismes impliqués dans le transport et la fusion membranaire des corps multi-vésiculaires.** ARF6 : ADP ribosylation factor 6 ; ILV : Intraluminal vésicules ; MVB/MVE : Multivesicular Body/Endosome ; RAB/RAL : Ras relatif protéine ; SNAP : Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein ; SNARE : SNAP Receptor ; SYX-5 : Syntaxin-5 ; VAMP : Vesicle-associated membrane protein (adapté de van Niel *et al.*, 2018).

## 5. Composition des VEs

Le contenu des VEs varie selon la composition de la cellule d'origine. Les VEs sont des vecteurs de transport de molécules bioactives provenant des compartiments cytosoliques ou membranaires de leur cellule d'origine (85,117). Les bases de données Exo Carta (<http://www.exocarta.org>) et Vesiclepedia (<http://www.microvesicles.org>) répertorient l'ensemble des acides nucléiques, des protéines et des lipides qui ont été à ce jour identifiés dans les VEs (128). Longtemps assimilées à des débris cellulaires, les VEs sont maintenant considérées comme des vecteurs biologiques pouvant modifier ou réguler le métabolisme de cellules cibles par le transfert de molécules bioactives. Les VEs acheminent des acides nucléiques (ARNm, miARN, ADN...), des protéines (enzymes, protéines de la matrice extracellulaire) et des lipides (oléate, cholestérol, sphingolipides...) qui dérivent des cellules d'origine.

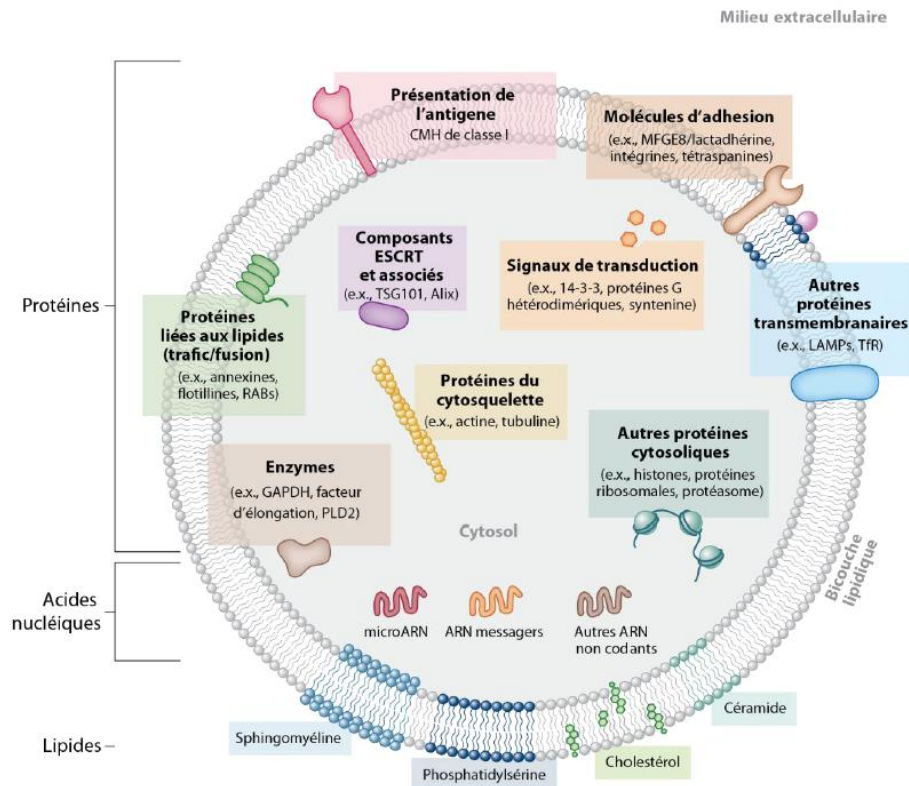
### *a) Composition des exosomes*

Les VEs d'origine endosomale contiennent des protéines impliquées dans la formation des CMV telles que les protéines d'adhésion (intégrines), les tetraspanines (CD9, CD63 et CD81), TSG101 et ALIX (87,129). Ces protéines sont les marqueurs les plus souvent utilisés pour caractériser les exosomes (**Tableau 3** et **Figure 6**). Par ailleurs, on y associe diverses enzymes dont les GTPases et des enzymes du métabolisme (péroxydases, pyruvate kinase, kinases et énoïase) (130). Toutes ces protéines ont pour origine le cytosol, la membrane plasmique ou endosomale (131). Certaines jouent un rôle dans la biogenèse des exosomes et se retrouvent abondamment dans ces derniers. Elles peuvent donc servir de marqueurs pour les identifier (TSG101, ALIX, CD63, CD81) (132). D'autres exosomes, qui ne sont pas associés à

l'endosome, sont particulièrement enrichis en éléments de la matrice extracellulaire comme la fibronectine ou la prothrombine (87).

**Tableau 3. Composition en protéines des VEs et leur fonctions biologiques associées (adapté de Y. Zhang et al., 2020)**

<b>Famille de protéines</b>	<b>Exemples de protéines</b>
Tetraspanines	CD63, CD9, CD81, CD82, CD37, CD53
Protéines de choc thermique	HSP90, 70, 27,60
Adhésion cellulaire	Intégrines, ICAM-1, lactadhérine
Présentation antigène	CMH1 et CMH2
Biogenèse CMV	TSG101, ALIX, RAB, Vps
Transport membranaire	LAMP1/2, CD12, régulateur PG-like
Signalisation	GTPase, HRas, protéines Ras, ERK, inhibiteur de dissociation du GDP, synthétine-1, RhoA
Composantes du cytosquelette	Actine, tubuline, moesine, myosine, cofiline-1
Synthèse protéique et transcription	Histone (123), protéines ribosomales, ubiquitine
Enzymes métaboliques	Acide gras synthétase, glycéraldéhyde -3-phosphate déshydrogénase, pyruvate kinase, ATPase, glucose -6-phosphate isomérase, aspartate aminotransférase, ATP citrate lyase, aldéhyde réductase
Trafic membranaire et fusion	RAB (5/7), annexines (I, II, IV, V, VI), dynamine, SNAP
Anti apoptotiques	ALIX, peroxydase,
Cytokines et facteurs de croissance	TNF alpha, récepteurs TNF, TGF beta
Récepteur de l'apoptose	Ligand FAS, ligand TNF
Transporteur du fer	Tfr



**Figure 6. Représentation schématique du contenu biochimique d'un exosome.** (Adapté de Colombo *et al.*, 2014)

La composition en lipides des exosomes est diversifiée (**Tableau 4**). Les lipides jouent un rôle dans le maintien de l'activité biologique par régulation du contenu lipidique (97). On retrouve du cholestérol, des sphingolipides, des phosphoglycérides, des céramides et des acides gras saturés (133). La membrane des exosomes est relativement rigide et stable, ce qui explique en partie leur durée de circulation plus importante dans les fluides biologiques (134). On note par exemple la présence de prostaglandines ou de leucotriènes, des molécules intervenant dans la réaction inflammatoire. Enfin, une fois l'exosome délivré à la cellule cible, ses composants

lipidiques peuvent prendre part aux cascades moléculaires et favoriser des réactions métaboliques.

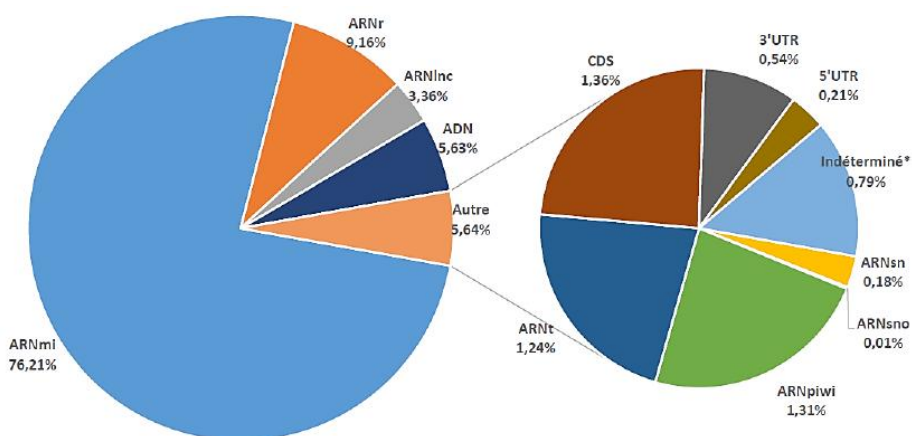
**Tableau 4. Composition en lipides des VEs et leur fonctions biologiques associées**

(Adapté de Y. Zhang et al., 2020)

Catégorie de lipides	Enzymes associées	Fonctions
Leucotriène A4, B4 et C4 (LTA4, LTB4, LTC4)	Hydrolase LT4, synthase LTC4	Ciblage de la migration leucocytaire
Prostaglandine E2 (PGE2), Prostaglandine de type J dérivée de PGD2 (15d- PGJ2)	Cyclooxygénase 1 et 2 (COX (1,2))	Immunosuppression, ligand PPAR $\gamma$
PGE2	PGE synthase	Inflammation
Acide phosphatidique (PA)	Phospholipase D2 (PLD2), Diacylglycerol kinase (DGK)	Accroît la production des exosomes
Acide arachidonique (AA), Lysophosphatidylcholine (LPC)	Cytosolic Phospholipase A2 (cPLA2), Calcium independant Phospholipase A2 (iPLA2)	Impliquée dans la courbure membranaire
	Secreted Phospholipase A2 groupe IIA et groupe V (sPLA2 IIA, sPLA2 V)	Biosynthèse des prostaglandines
Céramides	Neutral Sphingomyelinase 2 (nSMase2)	Tri du cargo des exosomes, courbure
Cholestérol		Régulation de l'excrétion des exosomes
Phosphatidylsérine		Impliquée dans le devenir des exosomes
Sphingomyéline		Cible de l'influx du calcium

Les exosomes transportent nombre d'ARN messagers (ARNm), de micro-ARN (ARNmi), et autres ARN non codants (ARNnc) (131,135) (**Figure 7**). Les ARNnc correspondent à l'ensemble

des ARN issus de la transcription de l'ADN mais qui ne seront pas traduits en protéines par la machinerie ribosomique. Ils interviennent toutefois à de nombreuses échelles dans la régulation de la synthèse protéique et/ou de la maturation des autres ARN. Parmi eux, on retrouve les miARN, les ARN ribosomiques (ARNr), les ARN de transfert (ARNt), les petits ARN nucléaires (ARNsn), les petits ARN nucléolaires (ARNsno), les longs brins d'ARN non codants (ARNlnc), et des ARN interagissant avec les protéines piwi (ARNpiwi). L'observation d'une différence entre un pool d'ARN exosomaux et un pool d'ARN de la cellule parentale définit une distribution sélective des ARN dans les exosomes (136,137). L'ensemble de ces ARN peut être à l'origine de modifications du phénotype de la cellule cible, participant ainsi au développement de certaines maladies (138,139).



**Figure 7. Composition en acides nucléiques des VEs** (adapté de (140)). \*La portion indéterminée représente la partie des ARN analysés n'appartenant pas au génome humain.

#### b) Composition des microvésicules

La composition des microvésicules en molécules bioactives est moins définie. Au niveau protéique, des études ont montré que les microvésicules pouvaient transporter des

glycoprotéines (141), des composantes du cytosquelette spécifiquement l'actine (142), des intégrines (143), des récepteurs et des ligands membranaires (144,145). De même les microvésicules ont la capacité de transporter des acides nucléiques tels que l'ADN, l'ARN et les microARN (146). Au niveau lipidique, les microvésicules semblent avoir un contenu commun avec les exosomes (la sphingomyéline, la phosphatidylsérine, la phosphatidylcholine, la phosphatidyléthanolamine, ainsi que les céramides) (85,147).

## 6. Méthodes d'études des VEs

Outre sa mission d'établir des critères de différenciation et de nomenclature des VEs, l'ISEV a aussi pour objectif principal d'établir les modalités d'études des VEs. Parmi les méthodes considérées, l'ultracentrifugation est à l'heure actuelle la méthode de référence pour l'étude des exosomes, cependant plusieurs nouvelles techniques font leur apparition (148,149). Il est important de noter que toutes les méthodes actuellement utilisées ne permettent pas d'obtenir in fine des populations complètement purifiées et homogènes de VEs (90,150).

### a) *Méthodes d'isolement*

Un comparatif entre les différentes techniques utilisées dans l'isolement des VEs est décrit dans le tableau 5.

**Tableau 5. Approche comparative des techniques d'isolement des VEs** (Adapté de Doyle et Wang, 2019)

Technique d'isolement	Rendement	Pureté	Volume de l'échantillon	Temps de procédure
Ultracentrifugation différentielle (UC)	5-25%	Faible	Plusieurs ml	8h
Centrifugation à gradient de densité	> UC	Faible	Jusqu'à 1 ml	20h
Kits de précipitation	NC	Faible	>100 µL	1 nuit ≈ 10h
Immunoprécipitation	>99% billes magnétiques	Plus élevée que UC	Jusqu'à 2 ml	25 minutes
Kit micro fluide par immunoaffinité ( <i>Exosearch</i> )	42-97%	Plus élevée que UC	20 µL	40 minutes

(1) Ultracentrifugation différentielle

L'isolement par centrifugation différentielle est la première méthode employée historiquement et reste la méthode de référence (148). La séparation des différents composants du milieu s'effectue par différence de densité, de taille et de forme, avec les particules les plus denses qui sédimentent en premier (151). Le principe, comme son nom l'indique, est de réaliser plusieurs centrifugations successives à vitesse croissante. En augmentant le degré de centrifugation par paliers, on sépare ainsi les débris cellulaires et les plus grosses vésicules des plus petites. Il est possible par ailleurs d'améliorer les rendements en augmentant la durée de centrifugation à vitesse élevée, avec le risque toutefois d'une possible dégradation des échantillons (152,153). L'avantage est que cette méthode est peu coûteuse et abordable techniquement, mais elle présente l'inconvénient de prendre beaucoup de temps à l'exécution, peu spécifique, et nécessite un échantillonnage volumineux (149,150).

## (2) Immunoprécipitation magnétique

Les techniques reposant sur l'affinité immunitaire utilisent la fixation d'anticorps dirigés contre les antigènes exprimés sur les exosomes (149). Sur la base de l'identification d'un marqueur purement spécifique aux exosomes, il est possible de les isoler des autres VEs avec certitude (152). La limite de cette technique est liée à son avantage, à savoir qu'on ne peut que cibler des antigènes de surface et que le ciblage est réduit à l'anticorps utilisé (154). Les anticorps choisis sont fixés sur des billes magnétiques, ce qui permet d'augmenter la surface de fixation et donc d'augmenter le rendement. Par ailleurs cette technique permet la prise en charge de volumes d'échantillons plus ou moins importants. Elle présente plusieurs avantages par rapport aux techniques classiques : elle donne en effet un meilleur taux de purification, est moins chronophage et permet de préserver l'activité exosomale (148).

## (3) Précipitation induite par le polyéthylène glycol (PEG)

Le PEG est un composé hydrophile, qui va entraîner la précipitation des particules de l'échantillon par fixation des molécules d'eau. Le précipité obtenu peut ensuite être traité par centrifugation pour mener les analyses en aval (152). Cette technique présente l'avantage d'être rapide, simple à mettre en place et ne nécessite que peu d'équipement (149), au détriment d'un grand manque de sélectivité au niveau du précipité obtenu : le précipité est un mélange grossier de VEs et d'agrégats protéiques (152).

(4) Précipitation induite par affinité membranaire

Cette technique a pour principe une interaction physico-chimique entre les marqueurs de surface des VEs et la membrane de la colonne du kit. Plus précisément la membrane est chargée positivement et va interagir avec les phospholipides anioniques, telles que la phosphatidylsérine, présent à la surface des VEs. Cette interaction permet la fixation des VEs qui ont une charge globale négative à la colonne. On parle d'une adsorption électrostatique sélective. Les avantages et inconvénients restent les mêmes que la précipitation par PEG.

D'autres techniques d'isolement des VEs plus ou moins récentes, telles que la microfluidique et l'isolement par la taille sont aussi détaillées dans le tableau 6.

**Tableau 6 : Avantages et inconvénients des techniques d'isolement (d'après Zhang et al., 2018; Li et al., 2017).**

Techniques	Principe	Avantages	Inconvénients
Ultracentrifugation	Séparation séquentielle par la taille, la densité, la forme des particules et des solvants	Expertise technique faible, pas de pré-traitement nécessaire, peu onéreux	Utilise beaucoup de temps, nécessite de grands volumes d'échantillon, potentielles dégradation et contamination de l'échantillon, faible purification de l'échantillon
Isolement par la taille	Séparation par la taille uniquement avec utilisation d'une valeur seuil de poids moléculaire	<b>Ultrafiltration</b> : Rapide, nécessite peu de matériel, bonne portabilité <b>Filtration séquentielle</b> : préservation du matériel biologique <b>Chromatographie</b> : taux de purification élevé, préservation de l'intégrité vésiculaire, reproductibilité	<b>Ultrafiltration</b> : Risque de lyse vésiculaire et de perte de rendement par agrégats sur la membrane. <b>Chromatographie</b> : Utilise beaucoup de temps, faible débit et rendement moyen, nécessité d'étalonner
Précipitation	Modification de la solubilité en utilisant des polymères	Facilité d'utilisation, peu d'équipement spécifique, volume d'échantillonnage variable, rapide, rendement élevé	Manque de sélectivité important et nécessité d'un pré/post-traitement, faible purification

Affinité immune	Ciblage de marqueurs antigéniques à la surface des exosomes	Très bon rendement d'isolement, bonne purification	Coût des réactifs, nécessité d'avoir un marqueur spécifique, faible capacité et faible débit, potentiels artéfacts et possible erreur de lecture liée à l'immunogénicité
Microfluidique	Isolement à échelle micrométrique selon les propriétés multimodales	Rapide, peu coûteuse, portable, automatisable	Défaut de standardisation et manque de bases de données, nécessité d'une validation des procédures

*b) Méthodes de caractérisation*

La caractérisation des VEs se faisait auparavant sur la base de la concentration protéique (150). Toutefois, en considérant les risques de contamination des échantillons et la variabilité des types de VEs, il est nécessaire de s'appuyer sur d'autres méthodes. On distingue deux types d'analyses : les études physiques et biochimiques. La complexité de la caractérisation des VEs repose en partie sur la variabilité des profils protéomiques qui dépend des méthodes d'isolement et de la souche cellulaire étudiée (155).

(1) Analyse physique

Les techniques dites d'analyse physique s'appuient sur la taille et/ou la concentration des particules dans l'échantillon.

*(a) Suivi individuel des particules par NTA (Nanoparticle Tracking Analysis)*

Cette méthode s'appuie sur l'application d'une formule scientifique, l'équation de Stokes-Einstein, qui lie le coefficient de diffusion des particules et leur mouvement brownien dans une chambre pour déterminer la taille des particules. Ce mouvement est capté grâce à un laser et

un microscope (156). C'est un logiciel qui traite ensuite l'image pour déterminer les caractéristiques de l'échantillon en termes de taille et de concentration (156). Cette méthode permet le suivi de particules entre 30 et 1000 nm de diamètre (157), mais idéalement celles entre 40 et 100 nm (c'est-à-dire les exosomes). L'inconvénient est, toutefois, qu'il nécessite un échantillon relativement pur, et que les agrégats ou particules trop concentrés peuvent biaiser le résultat. Il est aussi possible que les résultats varient selon l'alignement optique, les réglages de la caméra et l'opérateur (158,159).

*(b) Diffusion de lumière dynamique ou « Dynamic Light Scattering »*

Le principe est assez similaire au suivi individuel de particules. On mesure cette fois les fluctuations de l'intensité lumineuse pour estimer la taille des particules (158,159). L'avantage est que cette analyse, plutôt facile d'application, nécessite de faibles volumes (70 µL) et ne demande pas d'optimisation avancée de ses paramètres. L'inconvénient est l'analyse de mélanges hétérogènes : en effet les plus petites particules sont difficiles à détecter ce qui produit un biais en faveur de particules plus grandes. On préférera donc le suivi individuel à la diffusion de lumière dynamique pour l'analyse d'un échantillon hétérogène (159).

*(c) Microscopie électronique (MET)*

On utilise deux méthodes de microscopie électronique en général pour l'étude des VE. La microscopie électronique en transmission ou la microscopie électronique à balayage. La différence entre ces techniques repose sur la population d'électrons décomptée : la transmission comptabilise les électrons transmis à travers l'échantillon alors que le balayage compte les électrons dispersés par l'échantillon (157). La microscopie permet ainsi d'obtenir un calque ou

un négatif de l'échantillon. Les deux techniques donnent des résultats similaires en termes de distribution de taille des particules, mais de légères disparités de morphologies (160).

(d) *La cytométrie de flux*

C'est une analyse couplant analyse physique et biochimique. Elle permet de réaliser des analyses quantitatives et de classer les VEs sur la base de leur expression antigénique (161). Le principe est de fixer des billes sur des VEs et de les exposer à un anticorps couplé à un marqueur fluorescent. Cette méthode présente des inconvénients, notamment la limite de taille de détection des particules mais aussi la nécessité d'avoir des particules uniques en suspension : les agrégats diminuent fortement la précision de l'analyse (161).

(2) Analyse biochimique

On applique le principe de détection immunitaire, avec reconnaissance de pics mono ou polyclonaux correspondant à un anticorps et son antigène. Dans le cas des exosomes, il s'agit de rechercher un marqueur spécifique connu ou des protéines d'intérêt.

(a) *Le Western blot*

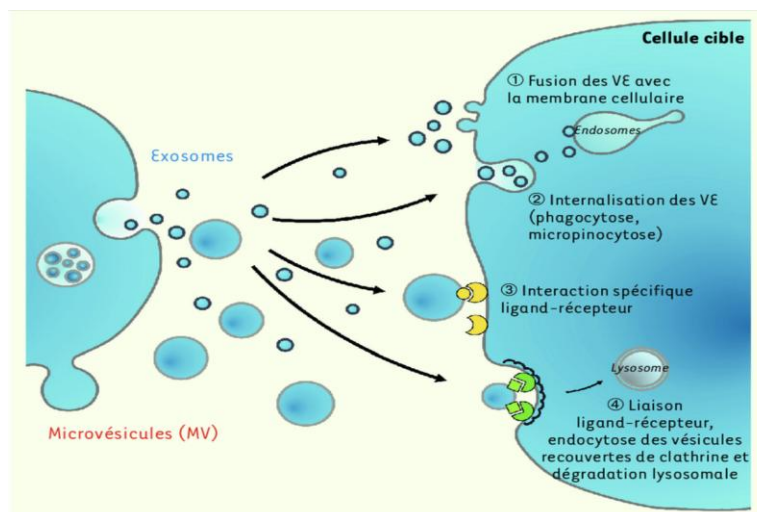
Le Western blot étudie la composition protéique des vésicules avec une lyse préalable (162). Les protéines sont ensuite séparées par une électrophorèse SDS PAGE et transférées sur une membrane spécifique. Cette membrane est ensuite exposée à une double reconnaissance antigène-anticorps avec marquage. Elle fait partie des méthodes les plus utilisées car facile d'utilisation et accessible. L'inconvénient majeur réside dans le défaut de reproductibilité lié à la qualité de l'anticorps sélectionné (162).

(b) *La protéomique*

Les analyses de spectrométrie de masse permettent de détecter et d'identifier des molécules en étudiant le rapport masse/charge après ionisation dans une chambre. On obtient alors des spectres spécifiques à des molécules et à la méthode d'ionisation utilisée. Ces résultats sont ensuite comparés à une banque de données préexistantes et permettent d'obtenir des données quantitatives et qualitatives des molécules présentes dans l'échantillon étudié (157). On applique deux approches dans le cadre de l'étude des exosomes. L'approche globale du protéome permet la comparaison du spectre obtenu après l'analyse des ions les plus abondamment retrouvés dans l'échantillon ou de l'ensemble des ions sur un intervalle de masse donné. C'est une approche qui s'intéresse au relevé d'un maximum de protéines et à leur quantification dans l'échantillon (157,163). L'avantage de ce procédé dans l'analyse des VEs est qu'il permet notamment l'étude rapide d'une grande partie du protéome dans une population exosomale, ce qui est important pour la recherche de biomarqueurs associés aux maladies. L'approche ciblée du protéome permet une détection et une analyse d'un ensemble défini de protéines dans l'échantillon (163). On associe un certain nombre de signaux spécifiques sur le spectre de masse pour chaque protéine, ce qui permet d'obtenir des informations très précises sur l'ensemble des protéines ciblées. En comparant les deux approches, l'approche ciblée reste la technique de choix dans l'étude des VEs car elle présente une très bonne spécificité et une grande multiplicité par rapport aux autres méthodes de caractérisation. Elle est d'autant plus indiquée que de plus en plus de marqueurs de VEs sont rapportés dans la littérature (163).

7. Mode de communication des VEs

Les VEs jouent un rôle majeur dans la communication intercellulaire par la transmission de signaux ou de molécules aux cellules et tissus cibles à travers plusieurs mécanismes (**Figure 8**). Premièrement, les VEs peuvent entrer dans la cellule cible par fusion directe entre la membrane vésiculaire et la membrane plasmique de la cellule et libérer leur contenu dans le cytosol de la cellule. Deuxièmement, les VEs sont internalisées par endocytose médiée par des processus de phagocytose ou de micropinocytose. Troisièmement, la communication VEs – cellules cibles peut se faire par une interaction spécifique entre les protéines présentes à la surface des VEs comme les tetraspanines, les intégrines ou encore les protéoglycanes et les récepteurs membranaires des cellules cibles. Cette interaction ligand-récepteur permet l'initiation de l'endocytose ou l'activation d'une voie de signalisation (164–167).



**Figure 8. Modes d'action des VEs.** Les VEs peuvent transmettre des informations aux cellules cibles par 3 mécanismes : la fusion avec la membrane plasmique de la cellule cible, par endocytose ou par interaction ligand-récepteur permettant soit la dégradation lysosomale soit l'activation d'une signalisation intracellulaire (Adapté de Le Lay et al. 2018).

## 8. VEs et muscle squelettique

La capacité du muscle squelettique à communiquer avec plusieurs tissus par la libération de myokines, de certains métabolites et de miARN met en évidence ses fonctions endocrines, paracrines et autocrines (168). Le muscle squelettique libère aussi des VEs, leur rôle connu est décrit dans les sections suivantes. Plusieurs études ont montré l'implication des VEs dans la physiologie du muscle squelettique (**Figure 9**). Il a été découvert que les VEs libérées par le muscle squelettique ont des fonctions paracrines et endocrines qui participeraient à la physiologie musculaire et pourraient avoir un impact sur l'homéostasie de tout le corps (47).

### *a) Rôle des VEs d'origine musculaires sur la différenciation musculaire*

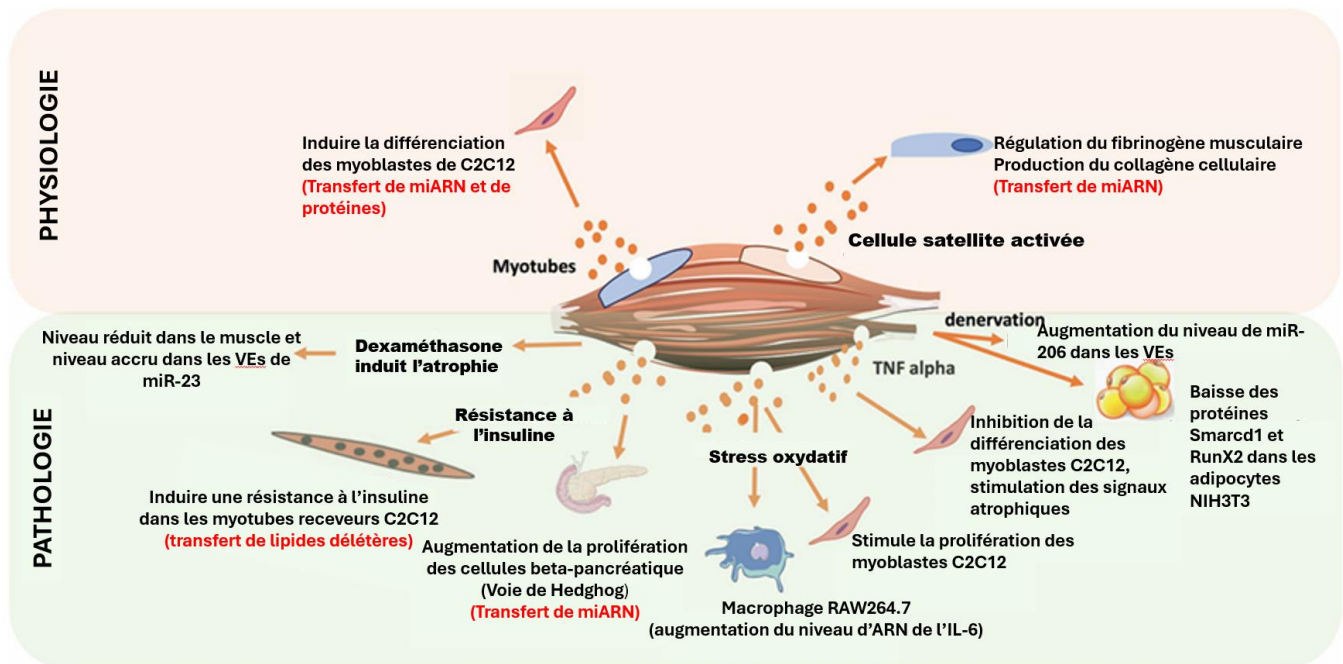
Les protéines et miARN des VEs dérivées de myotubes semblent impliqués dans le processus de myogenèse. Rome et al. ont démontré que les protéines et les miARN contenus dans les VEs isolées de myotubes étaient transférées dans les myoblastes en prolifération (169). Aussi, le traitement de myoblastes avec des VEs isolées de myotubes a entraîné une baisse des marqueurs précoces de différenciation et de prolifération des myoblastes (169). De plus, une analyse bio-informatique a montré que les gènes cibles des miARN étaient exprimés différemment dans les VEs isolées de myoblastes versus celles isolées de myotubes et que ces dernières semblaient être impliquées dans la régulation de voies de signalisation, spécifiquement de la voie de signalisation Wnt, connue pour être régulée pendant la myogenèse (170). Il a été aussi démontré que les miARN des VEs dérivées des myotubes étaient enrichis en miARN ciblant le domaine 3'-UTR de la protéine sirtuine 1 (SIRT1), impliquée dans la prolifération des cellules musculaires. Par conséquent, les miARN des VEs isolées de myotubes

pourraient avoir une fonction réductrice du niveau endogène de Sirt1 dans les myoblastes, induisant ainsi la différenciation cellulaire (171).

De manière intéressante, il a été constaté que l'élimination des VEs du sérum bovin (FBS) pendant la culture cellulaire semblait affecter la prolifération des myoblastes C2C12 (c'est-à-dire la diminution des niveaux d'ARNm de la cycline D1 et de Sirt1) et encourageait les cellules à se différencier prématurément (c'est-à-dire l'induction de l'ARNm de la myogénine avant la fusion des myoblastes) (172). Il a également été constaté que les myoblastes incubés avec des VEs libérées de myotubes prétraités avec du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> imitant un stress oxydant, pouvait conduire à une réduction du diamètre des myotubes et à une stimulation de la prolifération des myoblastes (173). Des résultats similaires ont été obtenus lorsque les myotubes ont été traités avec un mélange de cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$  et d'Interféron-gamma (INF- $\gamma$ )) (174). Ceci suggère qu'en plus de la myogenèse, les VEs dérivées de myotubes participeraient également au maintien et à la régénération de la masse du muscle squelettique après des lésions musculaires importantes.

Dans le contexte des maladies métaboliques, il a été montré que la résistance à l'insuline du muscle squelettique, induite par un régime riche en palmitate chez la souris, a déclenché la libération d'une nouvelle population de VEs enrichies en palmitate (175). Le palmitate contenu dans les VEs isolées des muscles de souris nourries avec le régime riche en palmitate a été transféré dans des C2C12 myotubes receveurs et a entraîné la régulation positive de 240 gènes impliqués dans le cycle cellulaire et l'adhésion cellulaire (175). Les marqueurs de différenciation musculaire (myogénine, myogenic differentiation 1 (MyoD1) et la créatine kinase mitochondriale (CKMT2)) ont été régulés à la baisse, montrant que les VEs dérivées des muscles de souris nourries par un régime riche en palmitate affectent le phénotype musculaire. En plus de la

libération d'une population spécifique d'exosomes, les souris nourries avec un régime enrichi en palmitate ont libéré davantage de microvésicules (175).



**Figure 10. Résumé des fonctions connues des VEs libérées par le muscle squelettique** (Adapté de Rome et al., 2019).

*b) Rôle des VEs musculaires sur les adaptations du muscle et d'autres organes à l'exercice physique*

Comme le muscle squelettique est l'organe spécifique de l'exercice, les variations des concentrations sanguines de VEs après une activité physique ont été étudiées (176). Les résultats indiquent qu'une seule séance d'exercice exhaustif semble déclencher la libération de VEs ayant un profil (taille et morphologie) d'exosomes. Ces VEs seraient éliminées de la circulation pendant la période de récupération précoce après l'activité physique intense tel qu'un exercice de résistance, mais resteraient à des niveaux sanguins élevés après un exercice

d'endurance de plus faible intensité (176). Cependant, cliniquement ces études restent spéculatives jusqu'à présent. Récemment, des VEs contenant de l'alpha-sarcoglycane (SGCA), un composant du complexe dystrophine-glycoprotéine impliqué dans la stabilité des membranes des fibres musculaires, ont été trouvées dans le plasma humain (177). Ces VEs étaient également positifs pour les protéines CD81, TSG101 et miR-206, toutes connues pour être fortement exprimées dans muscle squelettique. Ces marqueurs pourraient être utilisés pour différencier les VEs provenant du muscle en comparaison aux VEs provenant d'autres tissus. Certaines études ont aussi démontré l'implication des VEs musculaires dans les effets positifs de l'exercice sur la différenciation des cellules musculaires (175) et de la sensibilité à l'insuline (178,179). De plus, le nombre de VEs en circulation semble augmenter avec l'exercice physique (176,180), mais l'origine musculaire de ces VEs en circulation n'est pas claire. En effet, Watabane et son équipe ont récemment montré que l'exercice n'exerce aucune influence sur la libération des VEs dans la circulation sanguine. Leur étude suggère fortement que les VEs dérivées du muscle squelettique représentent une très faible proportion des VEs circulantes, et que les VEs libérées par la contraction musculaire agissent principalement localement (c'est-à-dire dans l'interstitium musculaire), au moins pour améliorer la myogenèse (181).

*c) Rôle des VEs dans le développement du DT2 et de la résistance à l'insuline*

L'implication des VEs dans la pathogenèse du diabète revêt un intérêt de plus en plus croissant de la part des spécialistes du diabète. En effet, les VEs sont des facteurs diagnostics et pronostics du DT2 prometteurs et pourraient être impliquées dans la pathogénèse du DT2 et des complications associées (164).

(1) Rôle des VEs dérivées du tissu adipeux dans le développement de la résistance à l'insuline et du DT2

Les VEs adipocytaires jouent un rôle important dans la communication intercellulaire et semble influencer le métabolisme, la sensibilité à l'insuline et la régulation de la croissance musculaire. Quelques études ont mis en évidence que des VEs provenant du tissu adipeux blanc pouvaient induire une insulino-résistance des tissus périphériques dans une situation d'obésité et/ou de DT2. Par exemple, l'injection intraveineuse d'exosomes dérivés de tissu adipeux de souris obèses à des souris saines est responsable du développement d'une résistance à l'insuline dans des cellules musculaires C2C12 médiée par l'activation de la voie de signalisation de TLR4/TRIF (TIR domain-containing adaptor protein-inducing IFN- $\beta$  factor) (182). De même, des exosomes dérivés d'explants de tissu adipeux humain induisent une résistance à l'insuline dans les hépatocytes en inhibant la phosphorylation d'Akt induite par l'insuline (183). Une étude récente a montré que les macrophages de tissu adipeux de souris obèses secrètent des exosomes enrichis en miARN-210-3p. Ces exosomes sont des véhicules aux adipocytes adjacents, aux cellules musculaires et hépatocytaires par des actions paracrines ou endocrines, influençant ainsi la sensibilité à l'insuline des cellules cibles (184). Le miR-210-3p va ainsi interagir avec la région 3'-UTR de l'ARNm de GLUT4 et réguler négativement son expression induisant ainsi une baisse significative de l'entrée intracellulaire du glucose (184). De même, le miR-27a contenu dans des exosomes en circulation est surexprimé dans un contexte de DT2 et positivement corrélé à l'obésité et à la résistance à l'insuline musculaire à la fois chez les souris db/db et C57BL/6J soumis à une diète riche en graisses à travers la répression médiée de PPAR $\gamma$  (185).

## (2) Rôle des VEs circulant ou produites par d'autres tissus dans le développement de la résistance à l'insuline musculaire

Des preuves récentes suggèrent que les VEs circulants peuvent véhiculer des signaux métaboliques et inflammatoires capables d'influencer la sensibilité à l'insuline des tissus périphériques. En particulier, leur contenu en cytokines ou protéines spécifiques et en miARNs pourraient participer à la propagation d'un état inflammatoire ou à la modulation négative des voies de signalisation de l'insuline.

L'analyse de miARN dans les exosomes a permis d'identifier le miR-20b-5p, particulièrement abondant chez les personnes ayant le DT2, dont la surexpression a entraîné une augmentation de la synthèse basale du glycogène dans des myotubes primaires humains. La surexpression de miR-20b-5p a aussi réduit la quantité d'AKTIP (protéine interagissant avec Akt), de STAT3 et compromis l'accumulation de glycogène induite par l'insuline dans des myotubes humains. En régulant à la baisse la protéine AKTIP, miR-20b-5p dérivé des exosomes inhibe la signalisation Akt (186).

Le miARN exosomal let-7b-5p dérivé des cellules pancréatiques cancéreuses semble capable d'induire une résistance à l'insuline dans les myotubes C2C12 à travers l'accumulation de lipides et l'activation de l'axe STAT3-FOXO1 (c'est-à-dire une inhibition de STAT3 induisant une activation de FOXO1), résultant en une diminution de l'expression d'IRS1 et de GLUT4 (187). Une autre étude a montré que le traitement de myotubes C2C12 avec des VEs circulantes dérivées de souris obèse et DT2 semble réduire significativement l'expression de l'ARNm de la chaîne lourde de myosine de type 1 (MHCI) et augmenter l'accumulation lipidique induisant une résistance à l'insuline musculaire (188).

### (3) Rôle des VEs produites par le muscle dans le développement de la résistance à l'insuline et le DT2

Le rôle des VEs dérivées du muscle squelettique dans un contexte de résistance à l'insuline et de DT2 a été très peu étudié. Néanmoins, Rome et son équipe ont montré que les VEs libérées par les cellules musculaires de souris soumises à un régime riche en palmitate (de l'ordre de 20%) semblent réguler à la hausse la taille et la masse des ilots pancréatiques. Aussi une diète de ce type a induit une surexpression du miARN-16 qui a altéré l'expression de Ptch1 (récepteur inhibiteur de la voie Sonic Hedgehog(Shh)) produisant un développement morphologique anormale des cellules bêta pancréatiques puis une altération de la sécrétion d'insuline (189).

## II. Problématique et objectif de l'étude

---

Le DT2 est une maladie métabolique complexe qui touche des millions de personnes dans le monde. Les VEs sont des particules membranaires anucléées libérées par un grand nombre de cellules et qui jouent un rôle crucial dans la communication intercellulaire. Des études récentes suggèrent que les VEs dérivées des cellules musculaires pourraient avoir un impact significatif sur le métabolisme du glucose et la régulation de l'insuline. Il a été aussi suggéré que les VEs produites par le muscle des patients atteints de DT2 pourraient différer des VEs produites par le muscle de sujets sains en quantité et en qualité (190,191). Cependant, le rôle des VEs dans le développement de la résistance à l'insuline musculaire n'est pas connue. De plus, malgré des progrès significatifs dans la recherche sur les VEs, leur isolement et leur caractérisation restent un défi majeur. La plupart des techniques de caractérisation ne permettent pas d'isoler des sous-groupes homogènes de VEs. À cet égard, nous présentons notre question de recherche comme suit :

**Les VEs dérivées de cellules musculaires primaires de personnes vivant avec le DT2 diffèrent-elles en contenu et morphologie de celles de personnes en santé ?**

L'objectif général de notre étude était d'identifier les propriétés physiques et biochimiques caractéristiques des VEs libérées par les cellules musculaires dérivées d'individus atteints de DT2 et de les comparer à celles libérées par les cellules musculaires de personnes en santé.

Les objectifs spécifiques étaient de :

- 1) Comparer différentes méthodes d'isolement des VEs, à savoir l'ultracentrifugation et trois kits commerciaux : ExoQuick, ExoEasy et EasySep.
- 2) Caractériser les VEs isolées de cellules musculaires primaires humaines issues de patients avec DT2 en comparaison à celles issues de sujets sains
- 3) Comparer la teneur en protéines des VEs produites par les myotubes de sujets sains par rapport à celle des VEs produites par les myotubes d'individus atteints de DT2.

La compréhension approfondie des différences morphologiques et moléculaires des VEs entre les individus sains et les personnes atteintes de DT2 pourrait révéler de nouveaux mécanismes pathophysiologiques et potentiellement conduire à des approches thérapeutiques innovantes. Ainsi, en identifiant des biomarqueurs spécifiques et en explorant les fonctions des VEs, ce travail contribuera à améliorer notre connaissance du DT2 et à développer des stratégies de traitement plus efficaces.

## III. Méthodologie

---

### A. Caractéristiques des participants

Le projet a été approuvé par les comités d'éthique de l'université d'Ottawa (H08-14-07), de l'hôpital Montfort (CA-04-09-13) et de l'université McGill (A04-M34-22A). Des participants ont déjà été recrutés dans le cadre du projet doctoral d'une autre étudiante (Léa Garneau) financé par la Société Francophone du Diabète. Le recrutement des participants a été défini en fonction des caractéristiques et des critères d'inclusion définis respectivement dans les tableaux 1 et 2 (voir annexe). Les critères d'exclusion sont définis dans le tableau 3 (voir annexe). A la suite du recrutement volontaire de patients, des biopsies du muscle vaste latéral ont été effectuées par Dr Trottier (Hôpital Montfort). Léa Garneau a isolées et purifiées des cellules musculaires à partir du protocole établi (192) de 9 sujets sains (témoins, mâles/femelles : 3/6), 15 personnes obèses (8/7) et 8 patients atteints de DT2 (0/8). L'ensemble des expériences de notre étude a été effectué sur des cellules musculaires primaires humaines de 3 participantes saines et 3 participantes vivant avec un DT2. Les cellules musculaires primaires humaines ont la propriété de conserver la sensibilité à l'insuline et les fonctions mitochondriales du muscle duquel elles proviennent dans des conditions en culture (192,193).

### B. Culture cellulaire

Les myocytes purifiés ont été cultivés dans du milieu Ham-F10 supplémenté avec 12 % de sérum fœtal bovin (FBS), 1  $\mu$ M de dexaméthasone, 10 ng/mL de facteur de croissance épidermique, 25 pmol/L d'insuline (provenant de pancréas bovin, MilliporeSigma), 1X d'antibiotiques/antimycotiques et 5  $\mu$ g/mL de gentamycine (tous les réactifs de culture cellulaire

provenaient de Wisent), dans 24 flacons T-75 recouverts de matrigel (Corning). Lorsque des confluences de 80-90% ont été atteintes, les cellules ont été différenciées pendant 5 à 7 jours dans du milieu DMEM 1g/L supplémenté avec 2% de FBS dépourvu de VEs (194). Le FBS dépourvu de VEs a été obtenu par ultracentrifugation selon les protocoles publiés (195,196). Au cours des 24 dernières heures de différenciation, les cellules ont été traitées dans un milieu constitué de DMEM 1g/L sans rouge phénol avec du FBS dépourvu de VEs. Ensuite le milieu conditionné a été collecté pour un total de 288 mL. Le milieu conditionné a été clarifié par une série de centrifugations différentielles dans le but d'éliminer les débris cellulaires et les larges particules. La première centrifugation a été effectuée à 200g pendant 10 minutes, puis le surnageant a été centrifugé à 4000g pendant 20 min. le surnageant résultant a été encore centrifugé pendant 30 minutes à 4°C à 20 000g puis filtré avec une unité de filtration de 0,22 µm et conservés à -80 °C pour l'extraction des VEs.

Par la suite, un nouveau protocole de culture a été utilisé. Ainsi de nouveaux myocytes ont été mis en cultures dans le même milieu de culture cité plus haut, cependant la différenciation et le traitement ont plutôt été effectués en plaque (6 puits) avec les mêmes conditions citées antérieurement. Le volume final de culture était de 24 mL par lignée cellulaire. La clarification du milieu a été effectuée comme citée plus haut. Lors de la clarification une étape de centrifugation à 20 000 g a été abandonnée. Cette étape de centrifugation a possiblement été un facteur de perte de vésicules dans le premier protocole avec les flasques de T75 (**Figure 11**). Les VEs pour ce protocole ont été isolées seulement avec les kits commerciaux ExoQuick et EasySep.

## C. Isolément des VEs

Le protocole utilisé pour l'isolement des VEs dans notre étude est résumé à la **Figure 11**.

### 1. Ultracentrifugation différentielle

Le milieu clarifié (190 ml) a été centrifugé à 100 000 g à 4°C pendant 70 min (Beckman Coulter L-100XP / rotor SW32TI). Le culot subséquent a été resuspendu dans du tampon phosphate salin froid (PBS) et ultracentrifugé de nouveau à 100 000 g pendant 70 min à 4°C. Le culot a par la suite été resuspendu dans 100 µL de PBS froid et aliquoté puis conservé à -80°C.

### 2. Méthodes de précipitation

#### a) *Précipitation induite par le polyéthylène glycol (PEG)*

Le principe du test ExoQuick repose sur l'utilisation du PEG pour précipiter les VEs en solution qui sont recueillies après une centrifugation à basse vitesse. Le kit utilisé pour isoler les VEs est l'ExoQuick- TC ULTRA EV pour milieu de culture tissulaire de System Biosciences (SBI). Ainsi 36 mL (14 mL pour la deuxième culture) de milieu clarifié ont été mélangés à la solution de PEG (ExoQuick-TC) à un ratio de 5:1, puis incubés 24h à 4°C. Ensuite, les VEs ont été isolées selon les recommandations du fabricant et conservées à -80°C. Brièvement, le mélange a été centrifugé à 3 000 g pendant 10 minutes à 4°C. Le culot obtenu a été resuspendu dans 200 µL du tampon B. Ensuite, 200 µL du tampon A ont été ajoutés aux VEs resuspendues. Le volume total a été appliqué sur la colonne puis centrifugé à 1 000 g pendant 30 secondes afin d'obtenir des VEs purifiées.

b) *Précipitation induite par affinité membranaire*

Le kit ExoEasy maxi de Qiagen utilise une colonne avec une membrane d'affinité électrostatique permettant la fixation des VEs sur la membrane et qui sont recueillies par élution. Le kit a été utilisé selon les instructions du fabricant. Le milieu de culture clarifié (36 mL) a été mélangé avec le tampon XBP dans un rapport volumique de 1:1, puis le mélange a été incubé à température ambiante pendant 3 minutes. Le mélange a été ajouté sur la colonne de centrifugation ExoEasy, puis centrifugé à 500 g pendant 1 minute à 4°C. L'écoulement a été rejeté, et 10 mL de tampon XWP (Exosome Wash Buffer) ont été ajoutés pour un lavage des exosomes fixés sur la colonne, puis centrifugés à 5 000 g pendant 5 minutes. Ensuite, 500 µL d'un tampon XE aqueux contenant principalement des sels inorganiques ont été ajoutés sur la colonne et centrifugés d'abord à 500 g pendant 5 minutes pour éluer les VEs. L'éluât a été réintroduit dans la colonne puis centrifugé de nouveau à 5 000 g pendant 5 minutes, puis l'éluât contenant les vésicules a été récupéré et conservé à -80°C.

c) *Immunoprécipitation magnétique*

Le kit EasySep de StemCell permet une capture sélective des VEs grâce à des billes magnétiques couplées à des anticorps spécifiques des VEs ciblées et sont récupérées à l'aide d'un aimant. Le kit qui utilise le principe de sélection positive, a été utilisé selon les instructions du fabricant. Les VEs contenues dans 2 mL de milieu de culture conditionné clarifié ont été marquées avec des complexes d'anticorps reconnaissant les tetraspanines (CD81 et CD63) ainsi qu'avec des billes magnétiques. Les VEs marquées ont ensuite été séparées à l'aide d'un aimant. Plus précisément, le test contient des billes magnétiques recouvertes d'anticorps spécifiques des tetraspanines CD63 et CD81, qui reconnaissent et marquent spécifiquement les

antigènes présents à la surface des VEs. Une étape de lavage a permis d'éliminer les composants non liés, et les VEs fixées aux billes ont été récupérées et conservées à -80°C pour des analyses ultérieures.

## **D. Caractérisation des VEs**

### **1. Test du NTA (Nanoparticules Tracking Analysis)**

Les VEs isolées de chaque test ont été diluées 1/1000 dans du PBS puis chargées (environ 750 µL) dans le NS500 (Particle Metrix). Les paramètres de sensibilité de la caméra, de la durée d'exposition et de la position de la focalisation ayant été préalablement réglés, l'acquisition de 3 à 6 vidéos de 60 secondes chacune a été effectuée. L'analyse a été effectuée automatiquement par le logiciel Zetaview 8.02.31 pour l'obtention des paramètres de taille moyenne (mode, médiane), de distribution de la taille et de la concentration (particules/mL) des vésicules.

### **2. Quantification des protéines et immunoblot**

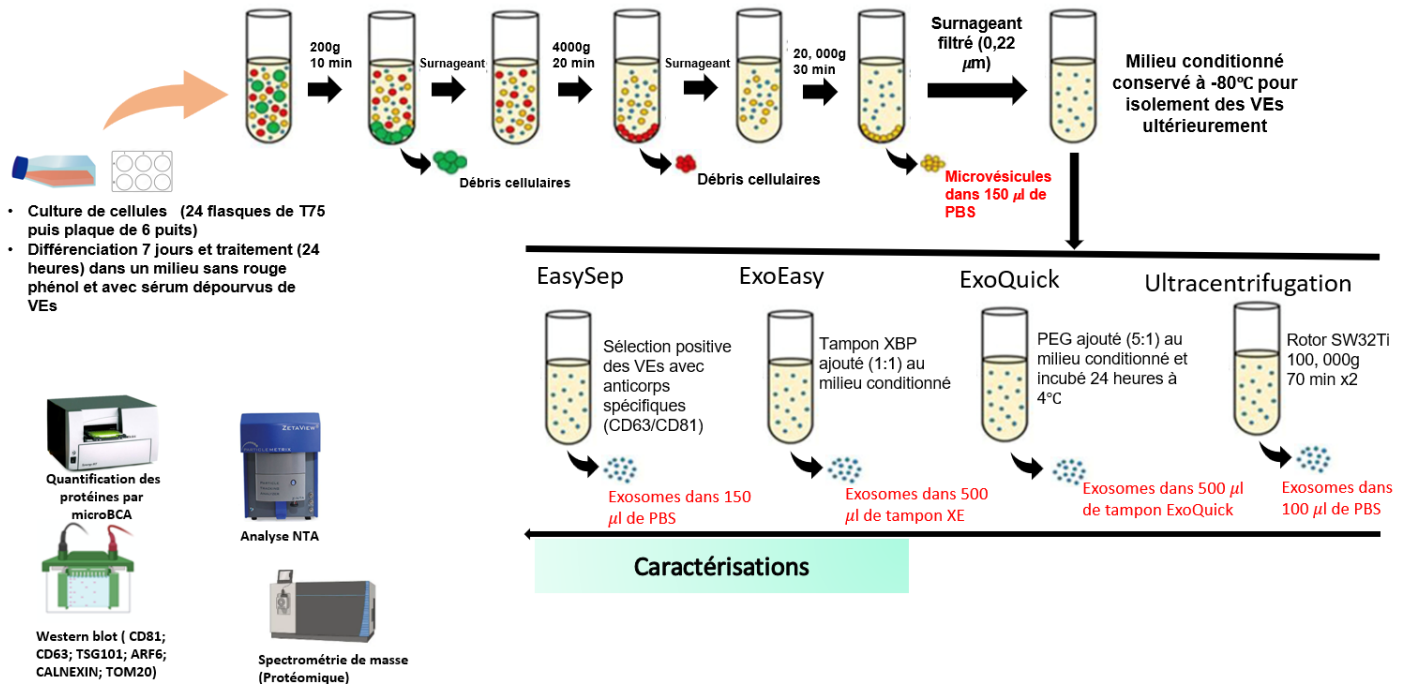
Les VEs ont été lysées, sur glace pendant 15 minutes, dans un tampon RIPA (20 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 250 mM saccharose, 1 % Triton 100X, 50 mM de fluorure de sodium (NaF), 5 mM de pyrophosphate de sodium (NaP), 1 mM orthovanadate de sodium) pour le premier protocole de culture puis par 0,1% de triton 100X pour le deuxième protocole de culture. Les échantillons ont été soniqués (3 courtes impulsions à une amplitude de 50), puis centrifugés à 14 000 g pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant a été récupéré puis mélangé à de l'acétone froid dans un ratio (1:4), puis incubé à -20°C pendant 24 heures. Le mélange a été centrifugé encore à 14 000 g pendant 15 minutes à 4°C, puis le surnageant rejeté. Le culot a été séché à l'air quelques minutes et resuspendu dans du PBS (197). La quantité de protéines dans les lysats cellulaires a été mesurée par la méthode de microBCA (Bicinchoninic acid assay) (Thermo Fisher) puis

diluée dans un tampon Laemmli classique (9 % SDS, 0,01 % bleu de bromophénol, 50 % glycérol, 62,5 mM Tris 0,5 M pH 6,8, 5 %  $\beta$ -mercaptoéthanol) pour visualiser les protéines autres que les tetraspanines, et du Laemmli modifié (sans  $\beta$ -mercaptoéthanol ou DTT) pour visualiser les tetraspanines. Ensuite les échantillons ont été chauffés à 95°C et 5 à 10  $\mu$ g de protéines ont été chargés sur un gel de polyacrylamide à 12 % pour une électrophorèse de sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Le transfert a été fait sur polyvinylidene fluoride (PVDF) toute la nuit à 4 °C à 30 V. Les bandes protéiques ont été visualisées après une coloration au rouge Ponceau (Thermo Fisher). Les membranes ont ensuite été bloquées pendant 1 heure à température ambiante dans une solution de TBST (20 mM Tris, 0,05 % Tween 20) (Thermo Fisher) contenant 5 % de lait en poudre. Les anticorps primaires suivants ont été utilisés, tous à une dilution de 1:1000 dans du TBST avec 5 % de BSA (albumine sérique bovine) sauf indication contraire : anti-calnexine monoclonal (C5C9, CellSignaling), anti-TSG101 monoclonal (E6V1X, CellSignaling), anti-CD63 monoclonal (Ts63, Invitrogen) dilué 1:250, anti-CD81 monoclonal (E2K9V, CellSignaling), anti-Arf6 monoclonal (D12G6, CellSignaling) et anti-Tom20 monoclonal (D8T4N, CellSignaling). Les membranes ont été incubées toute la nuit à 4 °C avec l'anticorps primaire choisi. Les anticorps secondaires utilisés étaient des anticorps anti-souris (sc-516102) et anti-lapin (sc-2357) conjugués à la peroxydase de raifort (HRP) (Santa Cruz), dilués à 1:5000 dans du TBST avec 5 % de lait en poudre, et incubés pendant 1 heure à température ambiante. La détection des protéines a été réalisée avec les kits SuperSignal West Pico Western Blot (34580, Thermo Scientific) ou Clarity Western ECL Substrate (170-5061, Bio-Rad), et les images obtenues avec ChemiDoc™ Imager et VisionWorks LS (UVP). L'expression des protéines a été quantifiée par analyse de densitométrie à l'aide du logiciel ImageJ (National Institutes of Health).

### 3. Protéomique

Après la lyse avec 0,1% de Triton 100X et la quantification protéique par microBCA des VEs comme décrits précédemment, 20 µg de protéines de chacune des lignées cellulaires ont été soumis au test de spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide (LC/MS) qui ont été effectués par la plateforme de protéomiques de l'Institut de recherche de l'Hôpital d'Ottawa. Les protéines ont été préparées selon la procédure opératoire standard (SOP) en utilisant la stratégie de purification par billes SP3. En résumé, les lysats protéiques ont été dilués avec du bicarbonate d'ammonium 100 mM, les protéines ont été dénaturées, alkylées, fixées aux billes, puis digérées sur billes avec une proportion de trypsine de 1:20. Les peptides ont été désalinisés à l'aide de StageTips C18 et leur concentration a été déterminée par Nanodrop, avec des résultats variant de 0,2 à 0,45 µg/µL. Un volume équivalent à 1 µg de peptides a été injecté dans le LC-MS avec un gradient long de 180 minutes afin de maximiser la profondeur protéomique. Les données ont été analysées avec le logiciel Fragpipe.

## Clarification du milieu conditionné



**Figure 11. Protocole d'isolement et de caractérisations des VEs.** Aperçu général de la méthodologie de l'étude des VEs pour chaque lignée cellulaire. Dans le deuxième protocole (culture en plaque) utilisé pour l'isolement des VEs, l'étape de centrifugation à 20 000g pendant 30 min a été supprimée de la clarification du milieu conditionné. Ensuite les tests d'ultracentrifugation et d'ExoEasy ont aussi été abandonnés.

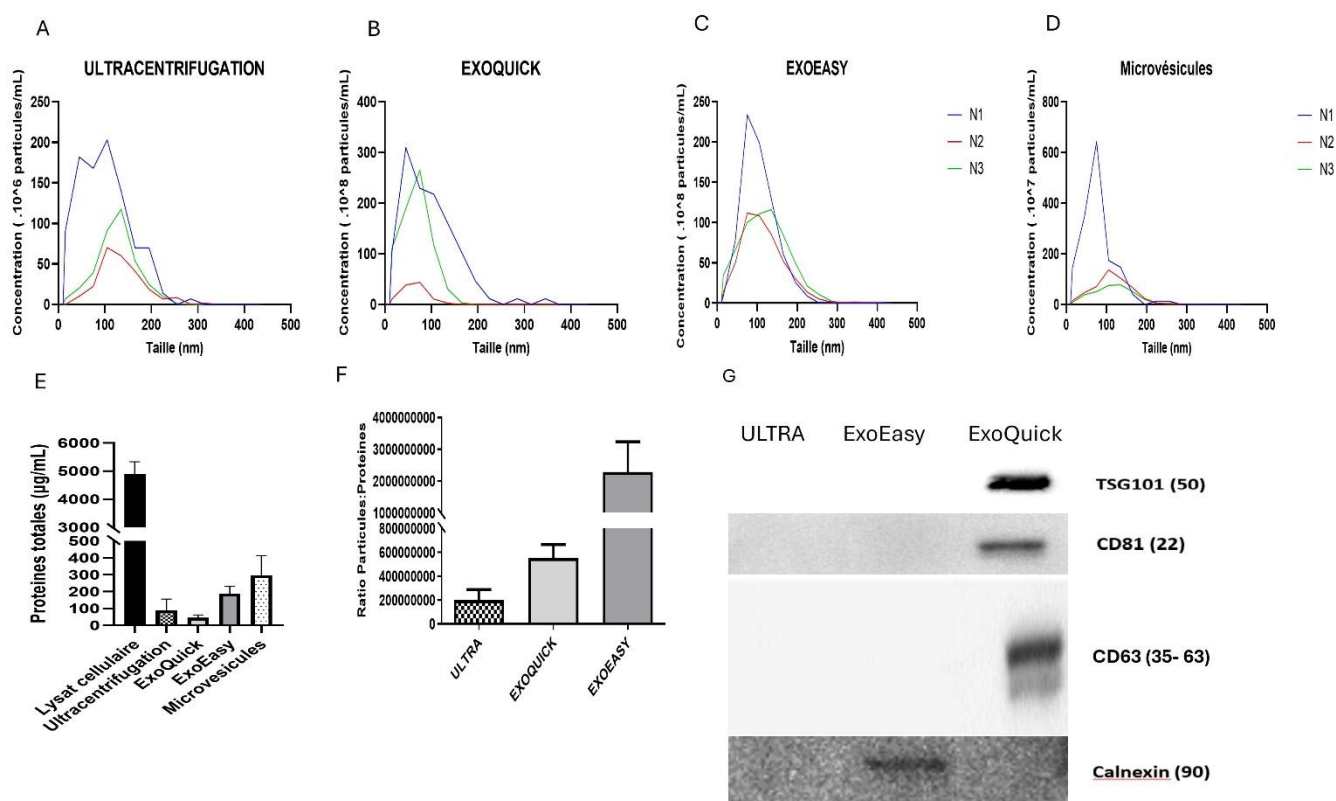
## IV. Résultats

---

### A. Caractérisation physique : comparaison du rendement en protéines et en particules des VEs selon différentes méthodes d'isolement

La comparaison entre les différents tests d'isolement des VEs dans la première partie de notre étude a été effectuée sur des myotubes primaires humains issus d'une personne en santé (M011) (**Figure 12**). Les données présentées illustrent des populations de VEs dont le diamètre est compris entre 50 et 150 nm (**Figure 12 A-C**). L'analyse par traçage de nanoparticules (NTA), qui permet d'estimer la concentration des VEs en solution, a révélé un rendement moyen supérieur pour le test ExoEasy ( $7,55 \times 10^{12}$  particules/ml), comparé à l'ultracentrifugation ( $7,87 \times 10^8$  particules/ml) et au kit ExoQuick ( $6,54 \times 10^{10}$  particules/ml). Le NTA a été aussi réalisé avec un isolat de microvésicules qui sont des vésicules récupérées à la fin de l'étape de clarification du milieu conditionné. Les résultats montrent une concentration de particules inférieure aux isolats obtenus avec les kits commerciaux, mais supérieure à celui de l'ultracentrifugation. Il est important de noter que l'ultracentrifugation permet d'obtenir des VEs de petites tailles par l'augmentation progressive de la force centrifuge (100 000g). Les petites vésicules peuvent être utilisées pour tous les tests de caractérisation, notamment le NTA (**Figure 12 A**). En ce qui concerne la quantification protéique des isolats de VEs, les résultats présentés indiquent également que la méthode ExoEasy produit la plus forte concentration en protéines parmi les trois approches testées (**Figure 12C**). Cette méthode a également généré les échantillons les plus purs, comme le suggère le ratio particules/protéines, un indicateur couramment utilisé pour évaluer la pureté des isolats de vésicules (198). Afin de mieux

caractériser la nature des vésicules isolées, un Western blot a été réalisé pour détecter plusieurs marqueurs exosomaux et éventuellement des contaminants selon les méthodes d'isolement (**Figure 12G**). Aucun marqueur protéique n'a pu être détecté dans les isolats vésiculaires obtenues par ultracentrifugation. Les marqueurs positifs d'exosomes : CD63 (53 kDa), TSG101 (50 kDa), et CD81 (22 kDa) ont bien été détectés dans les échantillons purifiés par ExoQuick. La protéine contaminante calnexine (90 kDa), un marqueur du réticulum endoplasmique, est présente dans l'isolat vésiculaire effectué avec ExoEasy, ce qui indique une contamination par des composants intracellulaires malgré l'apparente pureté basée sur le ratio particules/protéine (**Figure 12F**). Ces données montrent que malgré un ratio élevé particules/protéine, la méthode ExoEasy peut co-isoler des protéines non vésiculaires.



**Figure 12. Caractérisation physique et biochimique des VEs isolées de cellules musculaires primaires.** Tous les tests ont été effectués avec la lignée cellulaire M011 représentant une femme en

santé. A-D. Analyse par suivi de nanoparticules (NTA – *Nano Tracking Analysis*) mesure la distribution en taille et la concentration des particules isolées par ultracentrifugation, ExoQuick, ExoEasy et des microvésicules. L'analyse montre des vésicules dont la taille moyenne se situe entre 50 et 150 nm. Le panneau D représente les microvésicules récupérées à la fin de la clarification de milieu conditionné et aussi un contrôle positif car ces grandes vésicules ont généralement des tailles > 150 nm. Les différentes courbes représentent trois expériences indépendantes réalisées sur des cellules musculaires différenciées dérivées de la même biopsie musculaire. E. Concentration de protéines totales dans chaque échantillon réalisé sur le lysat cellulaire et les isolats de VEs selon le test utilisé. Les lysats cellulaires ont été extraits avec un tampon RIPA 1X, tandis que les isolats de vésicules ont été resuspendus dans du PBS 1X. La concentration en protéines a été déterminée à l'aide de la méthode microBCA. F. Ratio protéines/particules dans les VEs isolées représente le nombre total de particules/concentration en protéines (n = 3 expériences indépendantes). Les données sont présentées sous forme de moyenne  $\pm$  SEM (test T de Student). G. Expression de différentes protéines cibles spécifiques des VEs. La calhexine représente un contrôle positif de contamination identifiant une protéine du réticulum endoplasmique.

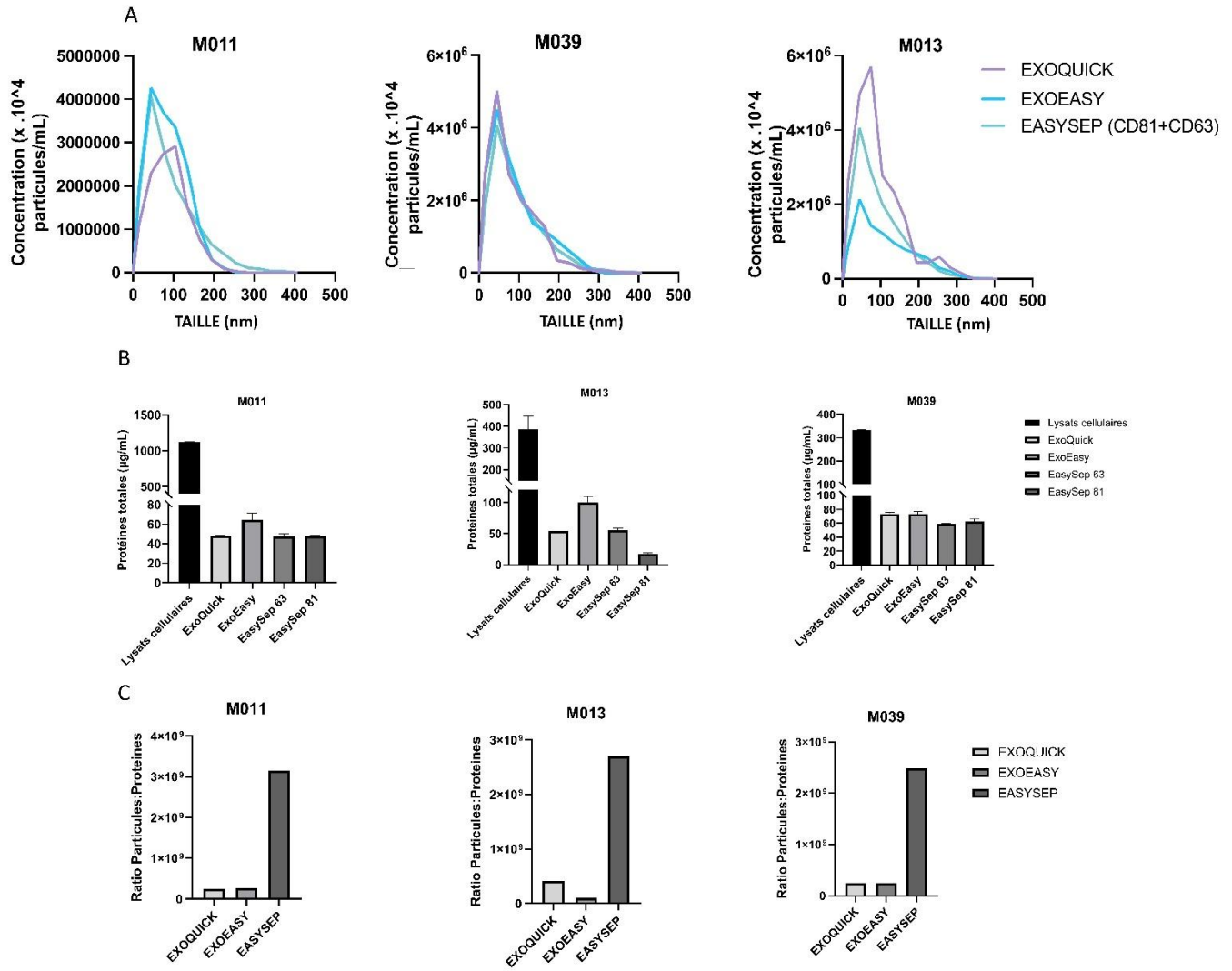
## **B. Évaluation du rendement et des caractéristiques physiques des VEs isolées de cellules musculaires**

Pour la suite des études, nous avons abandonné le test d'ultracentrifugation à cause du très faible rendement protéique qui n'a pas permis de détecter les protéines marqueurs des VEs, mais aussi à cause du grand volume de cellules dont on a besoin pour le test. Ainsi, le test de NTA, la quantification protéique par microBCA et l'expression du ratio particules : protéines ont été effectués seulement avec les kits commerciaux ExoQuick, ExoEasy et EasySep.

La quantification des protéines totales a révélé des différences marquées selon la méthode d'isolement des VEs et la lignée cellulaire utilisée (**Figure 13**). Pour les lignées M011 et M013, ExoEasy a permis d'obtenir une quantité de protéines plus élevée que ExoQuick, mais celles-ci étaient similaires pour la lignée M039. L'analyse par traçage de nanoparticules (NTA) a permis

de caractériser le profil en taille et en concentration des particules isolées. Les profils de distribution de taille montrent encore une fois une majorité de vésicules de tailles inférieures à 150 nm pour toutes les méthodes, correspondant à la taille attendue des exosomes (30–150 nm). Toutefois, la concentration de VEs varie d'une méthode à l'autre en fonction de la lignée cellulaire utilisée. Pour la lignée M011, les concentrations en moyenne des VEs isolées sont plus importantes avec le kit EasySep ( $3,8 \cdot 10^{10}$  particules/mL) et ExoEasy ( $4,1 \cdot 10^{10}$  particules/mL) comparativement à ExoQuick ( $2,7 \cdot 10^{10}$  particules/mL). Concernant la lignée M013, ExoQuick ( $5,5 \cdot 10^{10}$  particules/mL) a permis d'isoler un nombre total de particules plus élevé que les 2 autres méthodes ( $3,9 \cdot 10^{10}$  particules/mL pour EasySep et  $2,2 \cdot 10^{10}$  particules/mL pour ExoEasy). Enfin, pour la lignée M039, les 3 méthodes donnent des concentrations en VEs très similaires (ExoQuick :  $4,2 \cdot 10^{10}$  particules/mL, EasySep :  $3,9 \cdot 10^{10}$  particules/mL et ExoEasy :  $4 \cdot 10^{10}$  particules/mL).

Afin d'évaluer l'efficacité des différentes méthodes d'isolement des VEs, nous avons comparé le ratio particules/protéines. Pour chacune des lignées cellulaires, le test EasySep (CD63/81 combiné) présente les ratios particules/protéines les plus élevés (en moyenne  $3,5 \cdot 10^9$  particules/ $\mu\text{g}$ ), tandis que ExoQuick et ExoEasy montrent des ratios plus faibles (en moyenne  $3,1 \cdot 10^8$  particules/ $\mu\text{g}$  pour ExoQuick et  $2,2 \cdot 10^8$  particules/ $\mu\text{g}$  pour ExoEasy).



**Figure 13. Caractérisation des VEs isolées de cellules musculaires primaires des trois participants en santé.** Les tests ont été effectués avec les cellules primaires humaines issues de 3 participantes en santé (M011, M013 et M039). A. L'analyse par suivi de nanoparticules (NTA) a été réalisée afin de mesurer la distribution en taille et la concentration des particules isolées par ExoEasy, ExoQuick, et EasySep. B. La quantification des protéines a été réalisée par microBCA sur les lysats cellulaires et les isolats vésiculaires (n = 3). Les données ont été présentées sous forme de moyenne ± SEM (ANOVA à une voie). C. Le ratio particules/protéines représente le nombre total de particules/la quantité totale de protéines en µg (n = 3).

## **C. Analyse des VEs libérées par des cellules musculaires provenant de donneurs en santé et de patients atteints de diabète de type 2 (DT2)**

Nous avons éliminé le test de ExoEasy de notre protocole pour la suite de l'étude du fait de la présence de la protéine calnexine, un marqueur positif de contamination, dans les isolats vésiculaires obtenue avec ce test. Les VEs libérées par des cellules musculaires dérivées des trois participantes saines et de trois personnes avec un DT2 ont été isolées à l'aide de deux méthodes ExoQuick et EasySep, puis les caractéristiques morphologiques et moléculaires ont été comparées entre les groupes de participantes.

### **1. Analyse par NTA des VEs**

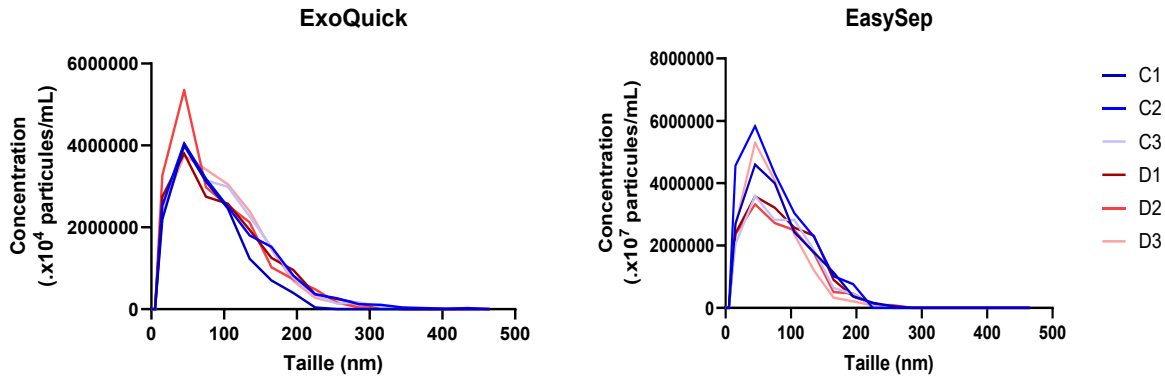
Le NTA a indiqué un rendement moyen plus élevé de VEs pour le test EasySep ( $4,3 \cdot 10^{13}$  particules/ml) comparé à ExoQuick ( $4,2 \cdot 10^{10}$  particules/ml). Les résultats pour ExoQuick ont montré que la taille moyenne a tendance à être plus petite pour les VEs libérées par les myotubes primaires des personnes avec un DT2 par rapport aux témoins saines (différence non statistiquement significative). Cependant, les résultats du test EasySep ont révélé des tailles de VEs plus variables sans différences nettes entre les VEs relâchées par les myotubes des témoins saines et ceux des patientes atteintes de DT2 (**Figure 14C-D**).

### **2. Comparaison du rendement protéique des VEs**

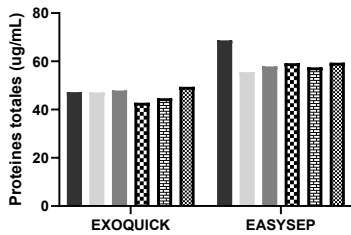
La quantification des protéines totales a montré une variabilité dans les isolats de VEs entre les participantes, mais avec une tendance générale qui montre que : les échantillons isolés par

ExoQuick présentait un rendement protéique modéré (moyenne de ~40-50 µg/mL) alors que ceux traités avec EasySep montraient des concentrations protéiques plus élevées, atteignant presque 80 µg/mL (**Figure 14 B**).

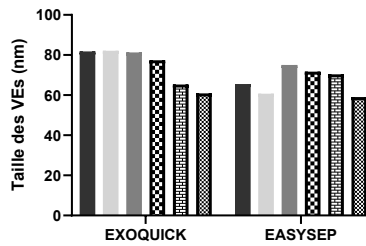
A



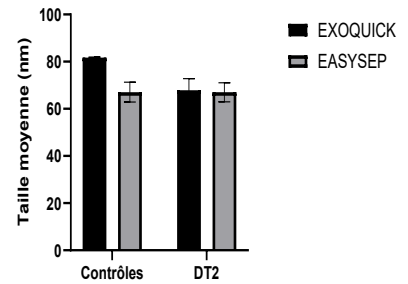
B



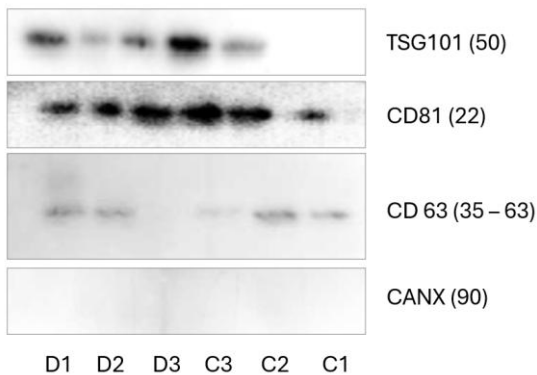
C



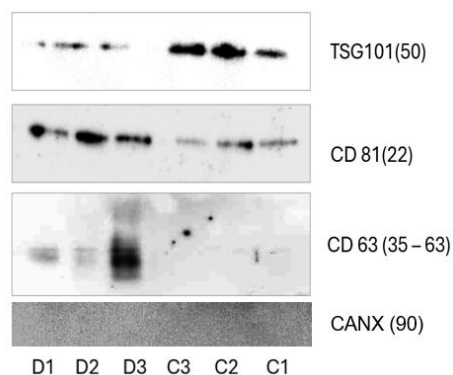
D



E



F



**Figure 14. Caractérisation morphologique et moléculaire des VEs isolées à partir de cellules musculaires primaires humaines de femmes en santé et de femmes avec le DT2.** A. L'analyse par Nano Tracking Analysis (NTA) a été réalisée afin de mesurer la distribution en taille et la concentration des vésicules extracellulaires (VEs) isolées à l'aide des kits ExoQuick (panel de gauche) et Easysep

(panel de droite). B. Quantification des protéines totales contenues dans les VEs isolées par la méthode ExoQuick et EasySep. C-D. Taille moyenne des VEs isolées par la méthode ExoQuick et Easysep. Le panel de gauche représente la taille moyenne des vésicules représentée individuellement pour chaque lignée cellulaire et celui de droite, la moyenne de chacun des groupes contrôle et DT2. Les données présentées selon la moyenne  $\pm$  SEM (ANOVA à une voie). E-F. Visualisation par Western blots (E : ExoQuick et F : EasySep) de l'expression de protéines spécifiques des VEs (TSG10, CD81 et CD3) et d'une protéine n'étant pas exprimée dans les VEs (calnexine, CANX). A-F. Les VEs libérées dans le milieu de culture par les myotubes primaires humains ont été isolées à l'aide des kits ExoQuick et Easysep. C1, C2, C3 : VEs libérées par des myotubes primaires provenant de 3 participantes saines ; D1, D2, D3 : VEs libérées par des myotubes primaires de 3 patientes atteintes de DT2.

### 3. Analyse par Western blot des marqueurs vésiculaires

Afin de valider la présence et la pureté des VEs isolées, une analyse par Western blot a été réalisée pour les marqueurs exosomaux classiques (TSG101, CD81, CD63) ainsi que pour le marqueur de contamination réticuloendoplasmique : la calnexine (CANX).

Concernant les VEs isolées par la méthode ExoQuick, les résultats des protéines cibles sont très variables entre les conditions (**Figure 14E**). Pour les cellules contrôles, la protéine TSG101 n'a pas été détectée dans les VEs de cellules C1, contrairement aux VEs des cellules C2 et C3. La protéine CD81 est exprimée fortement par les VEs dérivées des cellules DT2 et contrôles, contrairement à CD63 qui est exprimé faiblement. L'intensité des signaux de TSG101 est plus marquée dans les échantillons D1 et C3 pour ExoQuick. De manière intéressante aucune des VEs isolées par ExoQuick n'a exprimé la calnexine, suggérant une bonne pureté des isolats sans contamination.

Pour des échantillons isolés par EasySep, les marqueurs TSG101 et CD81 sont bien détectés dans tous les échantillons mais encore une fois, l'intensité des signaux de TSG101 est plus

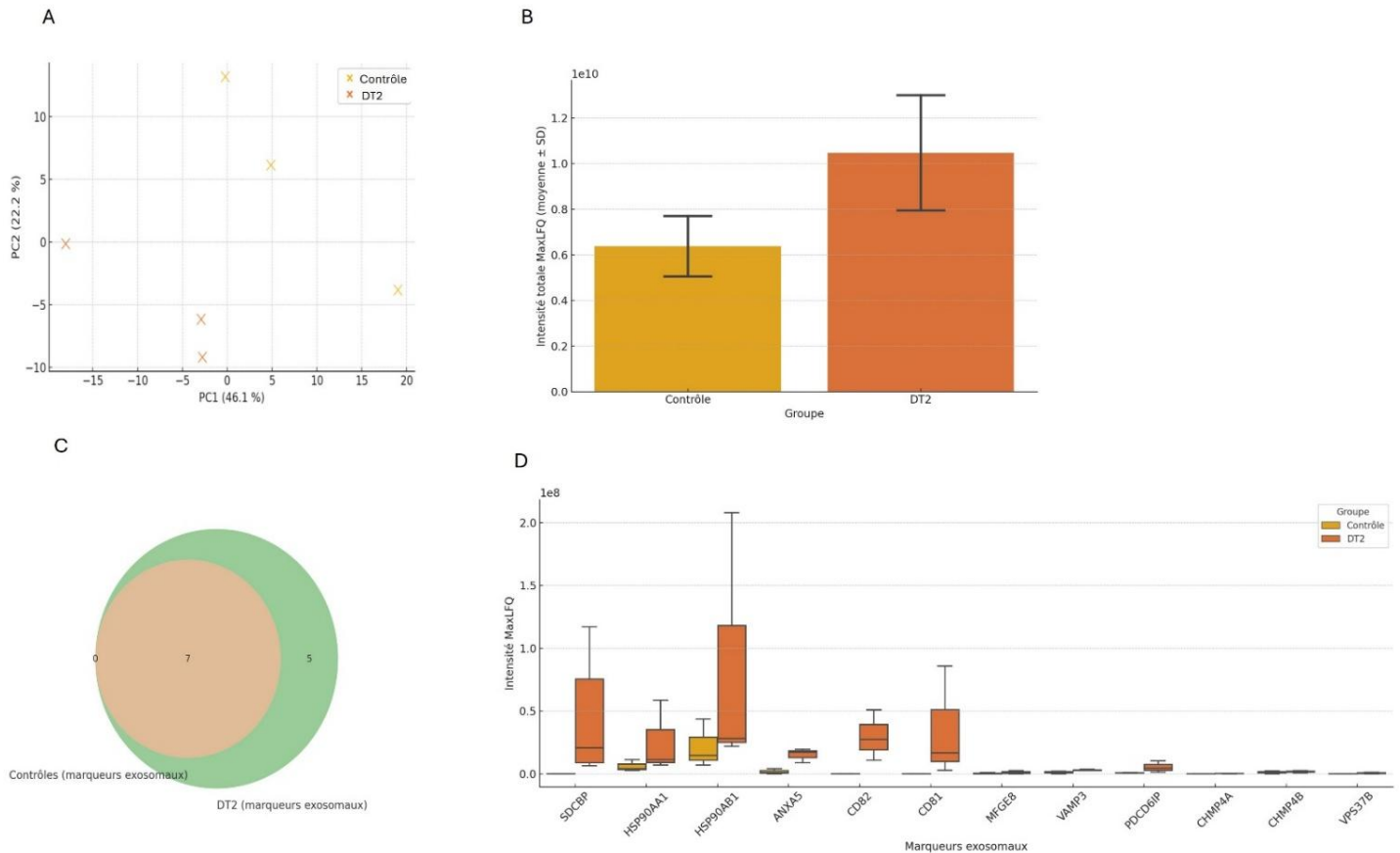
marquée dans les échantillons contrôles (C1-C3), alors que pour les échantillons DT2 (D1-D3), l'intensité des signaux est plus marquée pour la protéine CD81 (**Figure 14F**). Le marqueur CD63 est exprimé dans les échantillons DT2, mais son intensité est plus variable, particulièrement accentuée dans l'échantillon D3. Cependant dans les échantillons contrôles (C1-C3) l'expression de CD63 n'a pas été observée. Aucune détection de la protéine calnexine (CANX, 90 kDa) n'a été observée dans aucun des échantillons, indiquant l'absence de contamination et une bonne pureté des isolats. Ainsi, certains marqueurs des exosomes sont plus exprimés (CD63 et CD81) dans les VEs isolées à partir du milieu de culture de myotubes provenant de personnes DT2 avec la méthode EasySep, mais cela n'est pas le cas avec la méthode ExoQuick. Il est donc difficile de tirer des conclusions puisque ces résultats semblent dépendre de la méthode d'isolement.

Nos résultats montrent que les cellules musculaires humaines libèrent des VEs présentant des caractéristiques compatibles avec celles des exosomes, notamment en termes de taille, de concentration, et de contenu en marqueurs protéiques spécifiques aux exosomes. Ces données sont cohérentes avec les critères minimaux d'identification des exosomes définis par la communauté scientifique (48). La méthode ExoQuick a permis d'obtenir des VEs de taille moyenne inférieure (~75 nm) avec un bon rendement protéique et une forte expression des marqueurs exosomaux, sans détection de calnexine. De même, la méthode EasySep, bien que légèrement plus variable dans la distribution de taille, a permis d'obtenir des isolats vésiculaires riches en protéines spécifiques des exosomes, également exempts de contamination cellulaire. L'absence de calnexine dans les deux méthodes valide la pureté des isolats, ce qui est très important pour les analyses fonctionnelles ultérieures (199).

#### 4. Protéomique

L'analyse protéomique effectuée dans notre étude avait pour but d'avoir une compréhension du profil protéique des VEs isolées des différentes cellules contrôles et DT2. L'analyse des données a été réalisée à l'aide de la plateforme FragPipe. Un total de 847 protéines a été identifiées dans l'ensemble des échantillons. Plusieurs protéines caractéristiques des VEs de type exosomes, telles que CD81, CD63, ALIX (PDCD6IP), HSP70, HSP90, Flotillines (FLOT 1/2), Annexines (ANXA2) et RAB27A, et d'autres ont été détectées à des intensités très variables. La calnexine (CANX), marqueur du réticulum endoplasmique n'a été détecté dans aucun des échantillons.

L'analyse en composantes principales (ACP) a montré une tendance à la séparation entre les conditions contrôle et DT2 (**Figure 15A**). La projection des composantes principales PC1 et PC2 sur de nouvelles dimensions mettent en évidence la variabilité de l'étendue de la séparation entre les groupes d'échantillons contrôles et DT2.



**Figure 15. Analyse Protéomique des VEs isolées des cellules contrôles et DT2.** A. Représentation bidimensionnelle de chaque échantillon selon les deux premières composantes PC1 et PC2 issues de l'analyse en composantes principales (ACP). B. Histogramme de la moyenne des quantités totales de protéines détectées dans les VEs, regroupé par condition (Contrôle vs DT2) sur la base de 3 répliques biologiques par groupe (n = 3). C. Diagramme de Venn spécifique aux marqueurs exosomaux détectés dans les échantillons contrôles et DT2. Ce graphique montre les marqueurs exosomaux communs aux deux groupes (7), les marqueurs uniquement détectés chez les contrôles (0) et ceux uniquement détectés chez les DT2 (12). D. Boxplots des marqueurs exosomaux détectés, comparant les groupes Contrôle et DT2. Le test statistique t-test a été effectué pour n=3 répliques.

L'histogramme de la moyenne des intensités totales de protéines détectées dans les vésicules extracellulaires (**Figure 15B**) montre une légère hausse non significative (t-test non apparié =

0,135) de l'ensemble des protéines totales exprimées dans les isolats du groupe DT2 versus le groupe contrôle. Le diagramme de Venn spécifique aux marqueurs exosomaux détectés (**Figure 15C**) dans les échantillons contrôles et DT2 montre l'ensemble des marqueurs exosomaux communs aux deux groupes contrôles et DT2 (ANXA5, CHMP4B, HSP90AA1, HSP90AB1, MFGE8, PDCD61P et VAMP3) et des marqueurs uniquement détectés chez les DT2 (CD81, CD82, CHAMP4A, SDCBP, VPS373). On notera qu'aucune protéine uniquement spécifique aux contrôles n'a été détectée. Enfin des représentations en boxplots des principaux marqueurs exosomaux détectés (**Figure 15D**) sont comparés entre les groupes Contrôle et DT2. Cette analyse visait à identifier les différences qualitatives dans la composition protéique spécifique des VEs entre les groupes. Une grande variabilité dans l'expression des protéines a été observée, avec des protéines cibles qui n'ont pas été détectées (CD63 et TSG101). Malgré des différences marquées entre l'expression des protéines dans le groupe DT2 versus le groupe contrôle, aucune différence significative dans l'expression de l'intensité des protéines n'est notée pour les boxplots des marqueurs exosomaux (t-test non apparié corrigé par FDR).

## V. Discussion

---

### A. Comparaison des différentes méthodes d'isolement des VEs

Notre étude avait pour objectif de déterminer si les VEs libérées par les cellules musculaires primaires de personnes en santé étaient différentes en morphologie et en contenu de celles libérées par les cellules musculaires des participantes avec un DT2. Pour répondre à cette question nous avons, dans un premier temps, isolé les VEs avec l'ultracentrifugation et les kits commerciaux ExoEasy, ExoQuick et Easysep. Les résultats obtenus soulignent des différences intéressantes entre les méthodes utilisées en termes de morphologies, de rendement et de spécificité (**Tableau 7**).

Lors de notre test d'optimisation, avec la méthode d'ultracentrifugation, nous avons été en mesure d'obtenir des concentrations et des tailles (50-150 nm) de particules dans les normes attendues pour les exosomes. Cependant, le contenu protéique dans les isolats obtenus avec cette technique était très faible. Ainsi, nous n'avons pas pu visualiser les protéines cibles vésiculaires dans les isolats de VEs obtenues par ultracentrifugation. Malgré le fait que cette technique soit la méthode de référence pour isoler des VEs de petites tailles (exosomes) (85), nous l'avons abandonnée. Un inconvénient majeur de cette technique était aussi qu'elle nécessitait un grand nombre de cellules musculaire (24 T75) par culture pour un rendement très modéré en VEs. De plus, un autre inconvénient était le risque élevé de perte des VEs en raison des vitesses de centrifugation extrêmement élevées.

**Tableau 7 : Récapitulatif de la caractérisation des VEs selon la technique d'isolement.**

Méthode	Rendement (NTA)	Indice de pureté	Caractérisation morphologique + Marqueurs VEs (TSG101, CD63, CD81) et CANX	Protéomique
	OBJECTIF 1		OBJECTIF 2	OBJECTIF 3 (Seulement avec EasySep)
<b>ExoQuick</b>	Moyen ( $4,2 \cdot 10^{10}$ particules/mL)	Moyen	Rendement moyen + taille Tous les marqueurs exprimés (sauf CANX) + CD81 ++	<b>ACP : séparation nette entre groupe DT2 et sains</b>  <b>Intensité Protéique globalement élevée dans les VEs DT2</b>  <b>Marqueurs communs mais aussi spécifiques aux DT2 :</b> <b>SDCBP (Synténine 1)</b> <b>HSP90AA1</b> <b>HSP90AB1</b> <b>ANXA5 (Annexine A5)</b> <b>CD81</b> <b>CD82</b> <b>PDCD61P (ALIX)</b>
<b>EasySep</b>	Élevé ( $4,3 \cdot 10^{13}$ particules/mL)	Élevé	Rendement élevé + taille variable Tous les marqueurs exprimés (sauf CANX) + CD81 ++	
<b>ExoEasy</b> <b>(Retiré après objectif 1)</b>	Élevé	Élevé	<b>CANX ++</b> <b>(Contamination détectée)</b>	
<b>Ultracentrifugation</b> <b>(Retiré après objectif 1)</b>	Faible	Faible	Aucun marqueur détecté	
<b>Discussion</b>	ExoQuick et EasySep offre la meilleure balance rendement/pureté. La méthode semble influencer directement le rendement et la pureté des VEs.		Le phénotype vésiculaire reste globalement conservé, cependant le DT2 semble induire de fines altérations morphologiques	

Pour les méthodes d'isolement avec les kits commerciaux, nous avons été en mesure d'obtenir des concentrations et des tailles de particules dans les normes attendues. Les techniques d'ExoQuick et de ExoEasy ont permis de récupérer des quantités importantes de particules,

respectivement  $6,54 \cdot 10^{10}$  particules/mL et  $7,55 \cdot 10^{12}$  particules/mL, suggérant une bonne efficacité d'isolement. Toutefois, ces méthodes basées sur la précipitation ou la chromatographie par affinité de membrane sont connues pour co-isoler des contaminants tels que des agrégats protéiques ou des microvésicules non exosomales (200,201). La technique d'ExoEasy a également été abandonnée pour la suite de notre étude en raison de la présence de calnexine dans les isolats, marquant la présence de contaminant malgré un rendement élevés de particules dans les isolats et un indice de pureté semblant le plus élevé (**Figure 12G**).

À l'inverse, la méthode à base de billes magnétiques (EasySep), ciblant des tétraspanines spécifiques comme CD63 et CD81, permet un isolement plus sélectif des exosomes, bien que son rendement soit moindre. Cette faible quantité de particules et de protéines pourrait refléter une meilleure pureté, mais aussi une dépendance à l'expression de ces marqueurs, qui peut varier selon le type cellulaire (87). Par conséquent, cette méthodes est particulièrement utile pour les analyses fonctionnelles ou les études protéomiques ciblées nécessitant une haute spécificité (202). Il est également important de noter que le nombre de particules mesuré par NTA ne reflète pas nécessairement la qualité des exosomes isolés. En effet, une forte concentration de particules peut résulter d'un enrichissement en contaminants, tandis qu'un faible nombre peut correspondre à une population exosomales plus homogène et pure (203). La combinaison des approches, incluant la quantification protéique, la caractérisation morphologique (ex. : NTA, TEM) et l'analyse des marqueurs, reste donc essentielle pour évaluer la qualité de l'isolement. La comparaison des méthodes d'isolement : ultracentrifugation, ExoQuick, ExoEasy et EasySep, a montré que seules les techniques ExoQuick et EasySep montraient un rendement et une pureté satisfaisant avec une absence de contamination dans les isolats des 2 techniques (**Tableau 7**).

## **B. Caractérisation des VEs isolées de cellules musculaires primaires humaines issues de patientes avec DT2 en comparaison à celles issues de sujets sains**

Après la comparaison des techniques d'isolement des VEs dérivées de cellules musculaires contrôles et DT2, il était important pour nous de comparer les caractéristiques morphologiques et le contenu des VEs isolées. Dans notre étude, une variabilité de la taille des VEs a été observée entre les échantillons contrôles et les échantillons DT2, avec une moyenne légèrement plus basse pour les VEs isolées des myotubes DT2 avec les deux tests. Bien que cette différence semble suggérer une altération potentielle de la biogenèse ou de la composition des VEs en contexte pathologique, il est important de prendre en compte les techniques d'isolement utilisées, ExoQuick par précipitation polymérique et EasySep par immunoaffinité (sélection positive) (**tableau 7**).

En effet, certaines études ont démontré que la méthode d'isolement pouvait affecter les caractéristiques morphologiques des VEs, notamment leur taille apparente. L'ExoQuick, est une technique qui tend à enrichir l'échantillon en agrégats, ce qui pourrait entraîner une sélectivité préférentielle à une taille légèrement plus élevée mesurée par des techniques telles que la NTA (48,204). D'un autre côté, l'EasySep, basée sur la sélection positive de marqueurs spécifiques comme CD63 ou CD81, permet une sélectivité plus précise de sous-populations de VEs, souvent de plus petite taille, cependant avec des biais de sélection excluant des populations de VEs qui n'expriment pas ces marqueurs (87). Les variations observées dans notre étude

pourraient possiblement refléter des altérations pathologiques réelles du profil des VEs chez les patients DT2, mais aussi une spécificité de la technique d'isolement utilisée (**Tableau 7**).

Les concentrations en particules obtenues différaient selon la technique d'isolement utilisée, avec en moyenne environ  $4,2 \cdot 10^{10}$  particules/mL pour l'ExoQuick, contre  $4,3 \cdot 10^{13}$  particules/mL pour EasySep. Le rendement beaucoup plus élevé observé avec EasySep dans notre étude pourrait donc résulter d'une plus grande efficacité de sélection des VEs exprimant à la fois les anticorps cibles CD63 et CD81. De même, Crewe (2018) a montré dans son étude que les cellules endothéliales et le tissu adipeux, en condition de DT2, secrètent des VEs en plus grande quantité comparativement à une condition en santé (205). Cependant, dans notre étude, aucun des tests utilisés n'a permis d'avoir un rendement protéique net significatif entre les VEs isolées de cellules musculaires provenant des patientes avec les DT2 comparé aux sujets contrôles. Ces données nous permettent de comprendre que l'expression quantitative des VEs doivent être interprétées selon la technique utilisée.

Comme observé avec nos données sur la taille et le rendement protéique des VEs isolées, l'immunoblot a montré de la variabilité dans l'expression des protéines cibles (TSG101, CD63 et CD81) entre les méthodes d'isolement utilisées dans notre étude. De manière surprenante, l'expression de TSG101 est plus faible dans les isolats DT2 contrairement aux isolats contrôles. La protéine TSG101, très importante dans la biogenèse des VEs en particulier des exosomes, étant une sous-unité du complexe ESCRT-I, devrait être exprimée de manière homogène dans l'ensemble des isolats indépendamment du test utilisé. Ainsi la variabilité de l'expression de TSG101 pourrait être liée au principe du test utilisé si on le compare à une autre protéine tout aussi spécifique des VEs, à savoir CD81. En effet, la protéine CD81, tetraspanine membranaire abondamment exprimée dans les exosomes, est bien exprimée dans tous les échantillons, avec

une intensité marquée et relativement homogène entre les deux groupes, surtout en condition de DT2. Cela semble suggérer que CD81 constitue un marqueur robuste, qui confirme la nature exosomale des vésicules isolées et qui ne semble pas être affecté par la technique utilisée. En revanche, l'expression de CD63, une autre tetraspanine associée aux membranes des corps multivésiculaires, présente un signal très variable et de plus faible intensité dans les échantillons, notamment dans les échantillons C3 et D3 pour l'ExoQuick et les contrôles pour EasySep. Cela pourrait s'expliquer par le fait que le signal de cette protéine étant élargi (35 – 65 kDa) dû à une glycosylation variable (87), elle serait moins robuste que CD81 et donc potentiellement instable selon la technique d'isolement utilisée. Enfin, l'absence de détection de calnexine (CANX), protéine du réticulum endoplasmique, dans l'ensemble des isolats, confirme l'absence de contamination cellulaire significative et atteste de la pureté des préparations vésiculaires, conformément aux critères recommandés par les directives MISEV2018 (48).

L'analyse protéomique des VEs révèle des différences intéressantes de composition entre les VEs isolées des myotubes contrôles et DT2. L'analyse en composantes principales (PCA, **Figure 15A**) montre une séparation des profils protéiques qui semble liée à l'état métabolique, suggérant une possible altération globale du contenu des VEs dans la condition DT2. Cette observation est corroborée par une tendance à l'augmentation de l'intensité protéique totale (MaxLFQ) dans les échantillons DT2 (**Figure 15B**), indiquant une sécrétion accrue de VEs dans ce contexte. L'analyse des marqueurs exosomaux par le diagramme de VENN révèle une faible détection et asymétrie entre les deux groupes : 7 marqueurs sont communs, 5 spécifiques aux échantillons DT2, et aucun spécifique aux contrôles (**Figure 15C**). Ce profil pourrait être expliqué par le stress métabolique associé au DT2 qui favoriserait l'expression de certains marqueurs vésiculaires, ce qui a également été observé dans des études sur le tissu adipeux et

hépatique dans l'obésité (205). Parmi les marqueurs exosomaux cibles (TSG101, CD63, CD81), seule la protéine CD81 a été détectée par LC-MS/MS dans nos échantillons, avec une tendance à une expression plus élevée dans les VEs dérivées de myotubes DT2 (**Figure 15D**). La surexpression de CD81 dans un contexte de DT2 pourrait refléter une augmentation de la libération d'exosomes enrichis en CD81, ou une reprogrammation des voies de tri membranaires favorisant son incorporation. Cette observation est cohérente avec nos données de Western blot, où CD81 était également bien détecté dans tous les échantillons, et constitue ainsi un élément solide de validation croisée entre les méthodes. L'absence ou la très faible détection des marqueurs classiques de VEs tel que TSG101 et CD63, par LC-MS/MS pourrait être liée à leur faible abondance, ou possiblement par la méthode d'isolément des VEs utilisée, comme cela a été rapporté dans d'autres études protéomiques de VEs (48,87). Ainsi, CD81 apparaît comme un marqueur important dans les VEs dérivées de cellules primaires humaines. Cependant, nos données sont encore trop préliminaires pour déterminer si ces marqueurs des exosomes sont réellement différemment exprimés dans des VEs isolées de milieu de culture de myotubes provenant de personnes en santé vs de personnes vivant avec un DT2.

Bien que nous nous sommes intéressés aux VEs musculaires, nos résultats semblent s'aligner sur les résultats de certaines études publiées récemment à propos des VEs plasmatiques, notamment celle de Freeman et al. (2018) qui montre une augmentation des VEs plasmatiques en condition de DT2, et celle de Zhao et al, (2023) qui montre un contenu protéique des VEs altéré et surtout l'expression de marqueurs de stress inflammatoires associés au DT2 (206,207). L'augmentation des VEs plasmatiques semble avoir une origine multi-tissulaire, à savoir les adipocytes, les plaquettes et les cellules endothéliales. Un dysfonctionnement du tissu adipeux ou encore une hyperactivation plaquettaire liée au stress métaboliques sont des causes

possibles de l'augmentation des VEs circulantes (208). Dans notre étude, il n'y a pas eu de différence significative entre les concentrations de VEs libérées par les cellules musculaires de DT2 et les VEs des cellules contrôles. En revanche, le contenu protéique des VEs isolées des cellules musculaires de DT2 a montré des signatures protéiques distinctes spécifiques au stress métabolique observé dans le DT2 (**tableau 7**). Cela semble suggérer une modulation du contenu protéique des VEs qui pourrait entraîner la résistance à l'insuline ou l'inflammation cellulaire à un niveau local. Ces résultats renforcent l'importance d'études fonctionnelles des VEs plutôt que de se limiter à leur quantification (209).

Ces données suggèrent que les VEs musculaires pourraient refléter l'état métabolique des cellules dont elles proviennent et constituer des biomarqueurs non invasifs pour le DT2, voire des vecteurs d'effets pathologiques via leur contenu moléculaire.

## **C. Limites de l'étude**

Cette étude présente certaines limites qu'il convient de souligner. Tout d'abord, l'absence de caractérisation morphologique par microscopie électronique à transmission (MET) limite la confirmation visuelle directe de la structure et de l'intégrité des vésicules extracellulaires isolées. Bien que les techniques de NTA et de Western blot aient permis de caractériser efficacement la taille, la concentration et la présence de marqueurs exosomaux, la MET demeure une méthode de référence pour observer la morphologie sphérique, l'homogénéité et l'intégrité membranaire des exosomes (48). De plus, l'étude n'a pas inclus d'analyse fonctionnelle du contenu des VEs (miARN, protéines actives) ni de validation biologique sur cellules cibles, ce qui aurait permis de mieux comprendre l'impact physiopathologique potentiel des VEs musculaires chez les sujets atteints de DT2. Enfin, la taille limitée de l'échantillon (n=3 par groupe) peut restreindre la portée statistique des comparaisons effectuées.

## VI. Conclusion

---

Cette étude a permis de caractériser morphologiquement et moléculairement les VEs libérées par des cellules musculaires humaines, en comparant des donneurs sains et des personnes avec un DT2. Nos résultats indiquent que les méthodes ExoQuick et EasySep permettent d'isoler des VEs de haute qualité, sans contamination de protéine du réticulum endoplasmique. La caractérisation morphologique des VEs et l'expression des protéines ne nous ont pas permis d'établir de différences significatives entre les VEs isolées de cellules contrôles versus les VEs isolées de cellules DT2. Cela est probablement dû à la trop grande variabilité des résultats entre les techniques utilisées. Le contenu des VEs a montré, à travers la protéomique, une expression solide de marqueurs vésiculaires tel que CD81 dont l'expression est plus marquée dans les isolats issus de myotubes de DT2. Nos données soutiennent l'idée que les VEs dérivées de myotubes DT2 sembleraient présenter un contenu en marqueurs exosomaux très important et stable pour une étude fonctionnelle.

# BIBLIOGRAPHIE

---

1. Organisation mondiale de la santé. Centre des medias rapport diabète [Internet]. 2024. Disponible sur: <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>
2. Agence de la santé publique du Canada. Le diabète au Canada : Perspective de santé publique sur les faits et chiffres [en ligne]. Ottawa (ON) : Agence de la santé publique du Canada; [Internet]. 2011 août. Disponible sur: [www.canada.ca/fr/sante-publique/services/publications/maladies-et-affections/diabete-canada-perspective-sante-publique-faits-chiffres.html](http://www.canada.ca/fr/sante-publique/services/publications/maladies-et-affections/diabete-canada-perspective-sante-publique-faits-chiffres.html)
3. Agence de la santé publique du Canada. Système canadien de surveillance des maladies chroniques (SCSMC), Outil de données 2000–2020, édition 2022 [en ligne]. Ottawa (ON) : Agence de la santé publique du Canada; 2023 [consulté le 30 août 2023] [Internet]. 2023. Disponible sur: <https://sante-infobase.canada.ca/scsmc/outil-de-donnees/?G=00&V=1&M=1>
4. Statistique Canada. Enquête canadienne sur les mesures de la santé (ECMS) [en ligne]. Cycles 1 à 6 combinés (2007–2019). Ottawa (ON) : Statistique Canada [Internet]. 2022 août. Disponible sur: [www.statcan.gc.ca/en/survey/household/5071](http://www.statcan.gc.ca/en/survey/household/5071)
5. Diabète Canada. Lignes directrices de pratique clinique 2018 de Diabète Canada pour la prévention et le traitement du diabète au Canada. Can J Diabetes. 42(Suppl 1): S1–S325 [Internet]. 2018. Disponible sur: <https://guidelines.diabetes.ca/ressourcesfrancaises>
6. JDRF. Causes of Type 1 Diabetes (en anglais seulement) [en ligne]. [Internet]. 2023 août. Disponible sur: [www.jdrf.org/t1d-resources/about/causes](http://www.jdrf.org/t1d-resources/about/causes)
7. Agence de la santé publique du Canada. Questionnaire canadien sur le risque du diabète CANRISK [en ligne]. Ottawa (ON) : Agence de la santé publique du Canada. [Internet]. 2017 août. Disponible sur: [www.healthycanadians.gc.ca/fr/canrisk](http://www.healthycanadians.gc.ca/fr/canrisk)
8. Organisation mondiale de la Santé. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications. Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus (WHO/NCD/NCS/99.2). 1999.
9. Merz KE, Thurmond DC. Role of Skeletal Muscle in Insulin Resistance and Glucose Uptake. Compr Physiol. 8 juill 2020;10(3):785-809.
10. Ghigo E, Porta M, éditeurs. Diabetes Secondary to Endocrine and Pancreatic Disorders [Internet]. S. Karger AG; 2014 [cité 21 janv 2025]. (Frontiers in Diabetes; vol. 22). Disponible sur: <https://www.karger.com/Book/Home/261384>

11. Petersen MC, Shulman GI. Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance. *Physiol Rev.* 1 oct 2018;98(4):2133-223.
12. Tenenbaum M, Bonnefond A, Froguel P, Abderrahmani A. Physiopathologie du diabète. *Rev Francoph Lab.* 1 mai 2018;2018(502):26-32.
13. Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes.* janv 2003;52(1):102-10.
14. Accili D, Talchai SC, Kim-Muller JY, Cinti F, Ishida E, Ordelheide AM, et al. When  $\beta$ -cells fail: lessons from dedifferentiation. *Diabetes Obes Metab.* 2016;18(S1):117-22.
15. Karaca M, Magnan C, Kargar C. Functional pancreatic beta-cell mass: involvement in type 2 diabetes and therapeutic intervention. *Diabetes Metab.* avr 2009;35(2):77-84.
16. Ndiaye FK, Ortalli A, Canouil M, Huyvaert M, Salazar-Cardozo C, Lecoœur C, et al. Expression and functional assessment of candidate type 2 diabetes susceptibility genes identify four new genes contributing to human insulin secretion. *Mol Metab.* 1 juin 2017;6(6):459-70.
17. Hernández EÁ, Kahl S, Seelig A, Begovatz P, Irmeler M, Kupriyanova Y, et al. Acute dietary fat intake initiates alterations in energy metabolism and insulin resistance. *J Clin Invest.* 1 févr 2017;127(2):695-708.
18. Eguchi K, Nagai R. Islet inflammation in type 2 diabetes and physiology. *J Clin Invest.* 3 janv 2017;127(1):14-23.
19. Lee YS, Wollam J, Olefsky JM. An Integrated View of Immunometabolism. *Cell.* 11 janv 2018;172(1-2):22-40.
20. Ferdaoussi M, Abdelli S, Yang JY, Cornu M, Niederhauser G, Favre D, et al. Exendin-4 protects beta-cells from interleukin-1 beta-induced apoptosis by interfering with the c-Jun NH2-terminal kinase pathway. *Diabetes.* mai 2008;57(5):1205-15.
21. Sato J, Kanazawa A, Watada H. Type 2 Diabetes and Bacteremia. *Ann Nutr Metab.* 2017;71 Suppl 1:17-22.
22. Vrieze A, Van Nood E, Holleman F, Salojärvi J, Kootte RS, Bartelsman JFWM, et al. Transfer of intestinal microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic syndrome. *Gastroenterology.* oct 2012;143(4):913-916.e7.
23. Plaisance V, Brajkovic S, Tenenbaum M, Favre D, Ezanno H, Bonnefond A, et al. Endoplasmic Reticulum Stress Links Oxidative Stress to Impaired Pancreatic Beta-Cell Function Caused by Human Oxidized LDL. *PLOS ONE.* 16 sept 2016;11(9):e0163046.

24. Dayeh T, Ling C. Does epigenetic dysregulation of pancreatic islets contribute to impaired insulin secretion and type 2 diabetes? *Biochem Cell Biol Biochim Biol Cell*. oct 2015;93(5):511-21.
25. DeFronzo RA, Ferrannini E, Sato Y, Felig P, Wahren J. Synergistic interaction between exercise and insulin on peripheral glucose uptake. *J Clin Invest*. déc 1981;68(6):1468-74.
26. Ussher JR, Koves TR, Cadete VJJ, Zhang L, Jaswal JS, Swyrd SJ, et al. Inhibition of de novo ceramide synthesis reverses diet-induced insulin resistance and enhances whole-body oxygen consumption. *Diabetes*. oct 2010;59(10):2453-64.
27. Bruce CR, Risis S, Babb JR, Yang C, Kowalski GM, Selathurai A, et al. Overexpression of sphingosine kinase 1 prevents ceramide accumulation and ameliorates muscle insulin resistance in high-fat diet-fed mice. *Diabetes*. déc 2012;61(12):3148-55.
28. Pratipanawatr W, Pratipanawatr T, Cusi K, Berria R, Adams JM, Jenkinson CP, et al. Skeletal muscle insulin resistance in normoglycemic subjects with a strong family history of type 2 diabetes is associated with decreased insulin-stimulated insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation. *Diabetes*. nov 2001;50(11):2572-8.
29. Ye J. Mechanisms of insulin resistance in obesity. *Front Med*. mars 2013;7(1):14-24.
30. Wu H, Ballantyne CM. Skeletal muscle inflammation and insulin resistance in obesity. *J Clin Invest*. 3 janv 2017;127(1):43-54.
31. Rieusset J, Bouzakri K, Chevillotte E, Ricard N, Jacquet D, Bastard JP, et al. Suppressor of cytokine signaling 3 expression and insulin resistance in skeletal muscle of obese and type 2 diabetic patients. *Diabetes*. sept 2004;53(9):2232-41.
32. Plomgaard P, Nielsen AR, Fischer CP, Mortensen OH, Broholm C, Penkowa M, et al. Associations between insulin resistance and TNF-alpha in plasma, skeletal muscle and adipose tissue in humans with and without type 2 diabetes. *Diabetologia*. déc 2007;50(12):2562-71.
33. Tanti JF, Gual P, Grémeaux T, Gonzalez T, Barrès R, Le Marchand-Brustel Y. Alteration in insulin action: role of IRS-1 serine phosphorylation in the retroregulation of insulin signalling. *Ann Endocrinol*. févr 2004;65(1):43-8.
34. Martins AR, Nachbar RT, Gorjao R, Vinolo MA, Festuccia WT, Lambertucci RH, et al. Mechanisms underlying skeletal muscle insulin resistance induced by fatty acids: importance of the mitochondrial function. *Lipids Health Dis*. 23 févr 2012;11:30.
35. Roberts CK, Hevener AL, Barnard RJ. Metabolic syndrome and insulin resistance: underlying causes and modification by exercise training. *Compr Physiol*. janv 2013;3(1):1-58.

36. Rains JL, Jain SK. Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. *Free Radic Biol Med*. 1 mars 2011;50(5):567-75.
37. Anderson EJ, Lustig ME, Boyle KE, Woodlief TL, Kane DA, Lin CT, et al. Mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> emission and cellular redox state link excess fat intake to insulin resistance in both rodents and humans. *J Clin Invest*. mars 2009;119(3):573-81.
38. Vinayagamoorthi R, Bobby Z, Sridhar MG. Antioxidants preserve redox balance and inhibit c-Jun-N-terminal kinase pathway while improving insulin signaling in fat-fed rats: evidence for the role of oxidative stress on IRS-1 serine phosphorylation and insulin resistance. *J Endocrinol*. mai 2008;197(2):287-96.
39. Kelley DE, He J, Menshikova EV, Ritov VB. Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes*. oct 2002;51(10):2944-50.
40. Montgomery MK, Turner N. Mitochondrial dysfunction and insulin resistance: an update. *Endocr Connect*. mars 2015;4(1):R1-15.
41. Antoun G, McMurray F, Thrush AB, Patten DA, Peixoto AC, Slack RS, et al. Erratum to: Impaired mitochondrial oxidative phosphorylation and supercomplex assembly in rectus abdominis muscle of diabetic obese individuals. *Diabetologia*. 1 févr 2016;59(2):396-7.
42. Morino K, Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Frattini J, Shatzkes N, et al. Reduced mitochondrial density and increased IRS-1 serine phosphorylation in muscle of insulin-resistant offspring of type 2 diabetic parents. *J Clin Invest*. déc 2005;115(12):3587-93.
43. Hernández-Alvarez MI, Thabit H, Burns N, Shah S, Brema I, Hatunic M, et al. Subjects with early-onset type 2 diabetes show defective activation of the skeletal muscle PGC-1 $\alpha$ /Mitofusin-2 regulatory pathway in response to physical activity. *Diabetes Care*. mars 2010;33(3):645-51.
44. Chang YH, Lin HY, Shen FC, Su YJ, Chuang JH, Lin TK, et al. The Causal Role of Mitochondrial Dynamics in Regulating Innate Immunity in Diabetes. *Front Endocrinol [Internet]*. 29 juill 2020 [cité 9 févr 2025];11. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/journals/endocrinology/articles/10.3389/fendo.2020.00445/full>
45. Ritov VB, Menshikova EV, He J, Ferrell RE, Goodpaster BH, Kelley DE. Deficiency of subsarcolemmal mitochondria in obesity and type 2 diabetes. *Diabetes*. janv 2005;54(1):8-14.
46. Ukropcova B, Sereda O, de Jonge L, Bogacka I, Nguyen T, Xie H, et al. Family history of diabetes links impaired substrate switching and reduced mitochondrial content in skeletal muscle. *Diabetes*. mars 2007;56(3):720-7.

47. Rome S, Forterre A, Mizgier ML, Bouzakri K. Skeletal Muscle-Released Extracellular Vesicles: State of the Art. *Front Physiol* [Internet]. 2019 [cité 3 nov 2022];10(JUL). Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31447684/>
48. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles* [Internet]. 1 janv 2018 [cité 3 nov 2022];7(1). Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30637094/>
49. Lötvall J, Hill AF, Hochberg F, Buzás EI, Di Vizio D, Gardiner C, et al. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *J Extracell Vesicles*. 2014;3:26913.
50. Witwer KW, Buzás EI, Bemis LT, Bora A, Lässer C, Lötvall J, et al. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J Extracell Vesicles*. 2013;2.
51. Fernández-Messina L, Gutiérrez-Vázquez C, Rivas-García E, Sánchez-Madrid F, de la Fuente H. Immunomodulatory role of microRNAs transferred by extracellular vesicles. *Biol Cell*. mars 2015;107(3):61-77.
52. EV-TRACK Consortium, Van Deun J, Mestdagh P, Agostinis P, Akay Ö, Anand S, et al. EV-TRACK: transparent reporting and centralizing knowledge in extracellular vesicle research. *Nat Methods*. 28 févr 2017;14(3):228-32.
53. Słomka A, Urban SK, Lukacs-Kornek V, Żekanowska E, Kornek M. Large Extracellular Vesicles: Have We Found the Holy Grail of Inflammation? *Front Immunol*. 2018;9:2723.
54. Chargaff E, West R. The biological significance of the thromboplastic protein of blood. undefined. 1946;
55. Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol*. 1967;13(3):269-88.
56. Aaronson S, Behrens U, Orner R, Haines TH. Ultrastructure of intracellular and extracellular vesicles, membranes, and myelin figures produced by *Ochromonas danica*. *J Ultrastruct Res*. juin 1971;35(5):418-30.
57. Dalton AJ. Microvesicles and vesicles of multivesicular bodies versus « virus-like » particles. *J Natl Cancer Inst*. mai 1975;54(5):1137-48.

58. van Blitterswijk WJ, Emmelot P, Hilkmann H a. M, Hilgers J, Feltkamp CA. Rigid plasma-membrane-derived vesicles, enriched in tumour-associated surface antigens (MLr), occurring in the ascites fluid of a murine leukaemia (GRSL). *Int J Cancer*. 1979;23(1):62-70.
59. Fox AS, Yoon SB. DNA-Induced Transformation in *Drosophila*: Locus-Specificity and the Establishment of Transformed Stocks. *Proc Natl Acad Sci*. nov 1970;67(3):1608-15.
60. Fox AS, Yoon SB, Gelbart WM. DNA-Induced Transformation in *Drosophila*: Genetic Analysis of Transformed Stocks. *Proc Natl Acad Sci*. févr 1971;68(2):342-6.
61. Mishra NC, Tatum EL. Non-Mendelian inheritance of DNA-induced inositol independence in *Neurospora*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. déc 1973;70(12):3875-9.
62. Trams EG, Lauter CJ, Salem N, Heine U. Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles. *Biochim Biophys Acta*. 6 juill 1981;645(1):63-70.
63. Kassis S, Lauter CJ, Stojanov M, Salem N. Exfoliation of the  $\beta$ -adrenergic receptor and the regulatory components of adenylate cyclase by cultured rat glioma C6 cells. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res*. mai 1986;886(3):474-82.
64. Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, Orr L, Turbide C. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J Biol Chem*. 5 juill 1987;262(19):9412-20.
65. Pan BT, Teng K, Wu C, Adam M, Johnstone RM. Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *J Cell Biol*. sept 1985;101(3):942-8.
66. Johnstone RM, Bianchini A, Teng K. Reticulocyte maturation and exosome release: transferrin receptor containing exosomes shows multiple plasma membrane functions. *Blood*. oct 1989;74(5):1844-51.
67. van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol*. avr 2018;19(4):213-28.
68. Heijnen HF, Schiel AE, Fijnheer R, Geuze HJ, Sixma JJ. Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. *Blood*. 1 déc 1999;94(11):3791-9.
69. Wilson J, Whitney J, Neutra M, Neutra M, Neutra M, Neutra M, et al. Biogenesis of the apical endosome-lysosome complex during differentiation of absorptive epithelial cells in rat ileum. *J Cell Sci*. 1991;100 ( Pt 1).

70. Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, Liejendekker R, Harding CV, Melief CJ, et al. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med*. 1 mars 1996;183(3):1161-72.
71. Zitvogel L, Regnault A, Lozier A, Wolfers J, Flament C, Tenza D, et al. Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nat Med*. mai 1998;4(5):594-600.
72. Marzesco AM, Janich P, Wilsch-Bräuninger M, Dubreuil V, Langenfeld K, Corbeil D, et al. Release of extracellular membrane particles carrying the stem cell marker prominin-1 (CD133) from neural progenitors and other epithelial cells. *J Cell Sci*. 1 juill 2005;118(Pt 13):2849-58.
73. Théry C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol*. août 2009;9(8):581-93.
74. Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J. Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol*. févr 2009;19(2):43-51.
75. Saeedi S, Israel S, Nagy C, Turecki G. The emerging role of exosomes in mental disorders. *Transl Psychiatry*. 28 mars 2019;9(1):122.
76. Bobrie A, Colombo M, Raposo G, Théry C. Exosome secretion: molecular mechanisms and roles in immune responses. *Traffic Cph Den*. déc 2011;12(12):1659-68.
77. Larabi A, Barnich N, Nguyen HTT. Emerging Role of Exosomes in Diagnosis and Treatment of Infectious and Inflammatory Bowel Diseases. *Cells*. 30 avr 2020;9(5):1111.
78. Kalluri R, LeBleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*. 7 févr 2020;367(6478):eaau6977.
79. György B, Szabó TG, Pásztói M, Pál Z, Misják P, Aradi B, et al. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci CMLS*. août 2011;68(16):2667-88.
80. Booth AM, Fang Y, Fallon JK, Yang JM, Hildreth JEK, Gould SJ, et al. Exosomes and HIV Gag bud from endosome-like domains of the T cell plasma membrane. *J Cell Biol*. 13 mars 2006;172(6):923-35.
81. Théry C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids. *Curr Protoc Cell Biol*. mars 2006;30(1).
82. Martínez MC, Andriantsitohaina R. Extracellular Vesicles in Metabolic Syndrome. *Circ Res*. 12 mai 2017;120(10):1674-86.

83. Morhayim J, Baroncelli M, van Leeuwen JP. Extracellular vesicles: specialized bone messengers. *Arch Biochem Biophys*. 1 nov 2014;561:38-45.
84. Simons M, Raposo G. Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication. *Curr Opin Cell Biol*. août 2009;21(4):575-81.
85. Colombo M, Raposo G, Théry C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2014;30:255-89.
86. Deatherage BL, Cookson BT. Membrane vesicle release in bacteria, eukaryotes, and archaea: a conserved yet underappreciated aspect of microbial life. *Infect Immun*. juin 2012;80(6):1948-57.
87. Kowal J, Arras G, Colombo M, Jouve M, Morath JP, Primdal-Bengtson B, et al. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 23 févr 2016;113(8):E968-977.
88. Anderson HC, Garimella R, Tague SE. The role of matrix vesicles in growth plate development and biomineralization. *Front Biosci J Virtual Libr*. 1 janv 2005;10:822-37.
89. Shen B, Fang Y, Wu N, Gould SJ. Biogenesis of the posterior pole is mediated by the exosome/microvesicle protein-sorting pathway. *J Biol Chem*. 23 déc 2011;286(51):44162-76.
90. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol*. févr 2013;200(4):373-83.
91. Hessvik NP, Llorente A. Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cell Mol Life Sci CMLS*. janv 2018;75(2):193-208.
92. Pols MS, Klumperman J. Trafficking and function of the tetraspanin CD63. *Exp Cell Res*. 15 mai 2009;315(9):1584-92.
93. Hurley JH. The ESCRT complexes. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. déc 2010;45(6):463-87.
94. Raiborg C, Stenmark H. The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature*. 26 mars 2009;458(7237):445-52.
95. Wollert T, Hurley JH. Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes. *Nature*. avr 2010;464(7290):864-9.
96. Stuffers S, Sem Wegner C, Stenmark H, Brech A. Multivesicular endosome biogenesis in the absence of ESCRTs. *Traffic Cph Den*. juill 2009;10(7):925-37.

97. Trajkovic K, Hsu C, Chiantia S, Rajendran L, Wenzel D, Wieland F, et al. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science*. 29 févr 2008;319(5867):1244-7.
98. Sphingolipid Metabolism and Neutral Sphingomyelinases | Request PDF. ResearchGate [Internet]. 22 oct 2024 [cité 14 févr 2025]; Disponible sur: [https://www.researchgate.net/publication/236195952\\_Sphingolipid\\_Metabolism\\_and\\_Neutral\\_Sphingomyelinases](https://www.researchgate.net/publication/236195952_Sphingolipid_Metabolism_and_Neutral_Sphingomyelinases)
99. Goñi FM, Alonso A. Effects of ceramide and other simple sphingolipids on membrane lateral structure. *Biochim Biophys Acta*. janv 2009;1788(1):169-77.
100. Kajimoto T, Okada T, Miya S, Zhang L, Nakamura S ichi. Ongoing activation of sphingosine 1-phosphate receptors mediates maturation of exosomal multivesicular endosomes. *Nat Commun*. 2013;4:2712.
101. Castro BM, Prieto M, Silva LC. Ceramide: a simple sphingolipid with unique biophysical properties. *Prog Lipid Res*. avr 2014;54:53-67.
102. Baietti MF, Zhang Z, Mortier E, Melchior A, Degeest G, Geeraerts A, et al. Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nat Cell Biol*. 3 juin 2012;14(7):677-85.
103. Villarroya-Beltri C, Baixauli F, Gutiérrez-Vázquez C, Sánchez-Madrid F, Mittelbrunn M. Sorting it out: regulation of exosome loading. *Semin Cancer Biol*. oct 2014;28:3-13.
104. Ghossoub R, Lembo F, Rubio A, Gaillard CB, Bouchet J, Vitale N, et al. Syntenin-ALIX exosome biogenesis and budding into multivesicular bodies are controlled by ARF6 and PLD2. *Nat Commun*. 18 mars 2014;5:3477.
105. Keerthikumar S, Chisanga D, Ariyaratne D, Al Saffar H, Anand S, Zhao K, et al. ExoCarta: A Web-Based Compendium of Exosomal Cargo. *J Mol Biol*. 22 févr 2016;428(4):688-92.
106. Kim DK, Kang B, Kim OY, Choi DS, Lee J, Kim SR, et al. EVpedia: an integrated database of high-throughput data for systemic analyses of extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles*. 2013;2.
107. Cocucci E, Racchetti G, Podini P, Meldolesi J. Enlargeosome Traffic: Exocytosis Triggered by Various Signals Is Followed by Endocytosis, Membrane Shedding or Both. *Traffic*. 2007;8(6):742-57.
108. Kalra H, Drummen GPC, Mathivanan S. Focus on Extracellular Vesicles: Introducing the Next Small Big Thing. *Int J Mol Sci* [Internet]. 6 févr 2016 [cité 3 nov 2022];17(2). Disponible sur: </pmc/articles/PMC4783904/>

109. McMahon HT, Boucrot E. Membrane curvature at a glance. *J Cell Sci.* 15 mars 2015;128(6):1065-70.
110. Tricarico C, Clancy J, D'Souza-Schorey C. Biology and biogenesis of shed microvesicles. *Small GTPases.* 2 oct 2017;8(4):220-32.
111. Nabhan JF, Hu R, Oh RS, Cohen SN, Lu Q. Formation and release of arrestin domain-containing protein 1-mediated microvesicles (ARMMs) at plasma membrane by recruitment of TSG101 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 13 mars 2012;109(11):4146-51.
112. Muralidharan-Chari V, Clancy J, Plou C, Romao M, Chavrier P, Raposo G, et al. ARF6-regulated shedding of tumor cell-derived plasma membrane microvesicles. *Curr Biol CB.* 1 déc 2009;19(22):1875-85.
113. Stachowiak JC, Schmid EM, Ryan CJ, Ann HS, Sasaki DY, Sherman MB, et al. Membrane bending by protein-protein crowding. *Nat Cell Biol.* sept 2012;14(9):944-9.
114. Snead WT, Hayden CC, Gadok AK, Zhao C, Lafer EM, Rangamani P, et al. Membrane fission by protein crowding. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 18 avr 2017;114(16):E3258-67.
115. Caruso S, Poon IKH. Apoptotic Cell-Derived Extracellular Vesicles: More Than Just Debris. *Front Immunol.* 2018;9:1486.
116. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* août 1972;26(4):239-57.
117. Lakhter AJ, Sims EK. Minireview: Emerging Roles for Extracellular Vesicles in Diabetes and Related Metabolic Disorders. *Mol Endocrinol.* 1 nov 2015;29(11):1535.
118. Gurunathan S, Kang MH, Jeyaraj M, Qasim M, Kim JH. Review of the Isolation, Characterization, Biological Function, and Multifarious Therapeutic Approaches of Exosomes. *Cells.* 3 avr 2019;8(4):307.
119. Sönnichsen B, De Renzis S, Nielsen E, Rietdorf J, Zerial M. Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11. *J Cell Biol.* 15 mai 2000;149(4):901-14.
120. Ostrowski M, Carmo NB, Krumeich S, Fanget I, Raposo G, Savina A, et al. Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat Cell Biol.* janv 2010;12(1):19-30; sup pp 1-13.
121. Sinha S, Hoshino D, Hong NH, Kirkbride KC, Grega-Larson NE, Seiki M, et al. Cortactin promotes exosome secretion by controlling branched actin dynamics. *J Cell Biol.* 18 juill 2016;214(2):197-213.

122. Song P, Trajkovic K, Tsunemi T, Krainc D. Parkin Modulates Endosomal Organization and Function of the Endo-Lysosomal Pathway. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 24 févr 2016;36(8):2425-37.
123. Hsu C, Morohashi Y, Yoshimura SI, Manrique-Hoyos N, Jung S, Lauterbach MA, et al. Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A-C. *J Cell Biol*. 19 avr 2010;189(2):223-32.
124. Savina A, Fader CM, Damiani MT, Colombo MI. Rab11 promotes docking and fusion of multivesicular bodies in a calcium-dependent manner. *Traffic Cph Den*. févr 2005;6(2):131-43.
125. Jahn R, Scheller RH. SNAREs--engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol*. sept 2006;7(9):631-43.
126. Pfeffer SR. Unsolved mysteries in membrane traffic. *Annu Rev Biochem*. 2007;76:629-45.
127. Rao SK, Huynh C, Proux-Gillardeaux V, Galli T, Andrews NW. Identification of SNAREs involved in synaptotagmin VII-regulated lysosomal exocytosis. *J Biol Chem*. 7 mai 2004;279(19):20471-9.
128. Kalra H, Simpson RJ, Ji H, Aikawa E, Altevogt P, Askenase P, et al. Vesiclepedia: a compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation. *PLoS Biol*. 2012;10(12):e1001450.
129. Mathivanan S, Lim JWE, Tauro BJ, Ji H, Moritz RL, Simpson RJ. Proteomics analysis of A33 immunoaffinity-purified exosomes released from the human colon tumor cell line LIM1215 reveals a tissue-specific protein signature. *Mol Cell Proteomics MCP*. févr 2010;9(2):197-208.
130. Mathivanan S, Fahner CJ, Reid GE, Simpson RJ. ExoCarta 2012: database of exosomal proteins, RNA and lipids. *Nucleic Acids Res [Internet]*. janv 2012 [cité 3 nov 2022];40(Database issue). Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21989406/>
131. Boriachek K, Islam MN, Möller A, Salomon C, Nguyen NT, Hossain MSA, et al. Biological Functions and Current Advances in Isolation and Detection Strategies for Exosome Nanovesicles. *Small Weinh Bergstr Ger*. févr 2018;14(6).
132. Zhang Y, Bi J, Huang J, Tang Y, Du S, Li P. Exosome: A Review of Its Classification, Isolation Techniques, Storage, Diagnostic and Targeted Therapy Applications. *Int J Nanomedicine*. 2020;15:6917-34.
133. Théry C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol*. août 2002;2(8):569-79.

134. Record M, Carayon K, Poirot M, Silvente-Poirot S. Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell-cell communication and various pathophysiologicals. *Biochim Biophys Acta*. janv 2014;1841(1):108-20.
135. Colombo M, Moita C, Van Niel G, Kowal J, Vigneron J, Benaroch P, et al. Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *J Cell Sci*. 15 déc 2013;126(24):5553-65.
136. Skog J, Würdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Sena-Esteves M, et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol*. déc 2008;10(12):1470-6.
137. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*. juin 2007;9(6):654-9.
138. Mittelbrunn M, Gutiérrez-Vázquez C, Villarroya-Beltri C, González S, Sánchez-Cabo F, González MÁ, et al. Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nat Commun*. 2011;2:282.
139. Zhang J, Li S, Li L, Li M, Guo C, Yao J, et al. Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting, and function. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. févr 2015;13(1):17-24.
140. Huang X, Yuan T, Tschannen M, Sun Z, Jacob H, Du M, et al. Characterization of human plasma-derived exosomal RNAs by deep sequencing. *BMC Genomics*. 10 mai 2013;14:319.
141. Falati S, Liu Q, Gross P, Merrill-Skoloff G, Chou J, Vandendries E, et al. Accumulation of tissue factor into developing thrombi in vivo is dependent upon microparticle P-selectin glycoprotein ligand 1 and platelet P-selectin. *J Exp Med*. 2 juin 2003;197(11):1585-98.
142. Bernimoulin M, Waters EK, Foy M, Steele BM, Sullivan M, Falet H, et al. Differential stimulation of monocytic cells results in distinct populations of microparticles. *J Thromb Haemost*. 2009;7(6):1019-28.
143. Mezouar S, Darbousset R, Dignat-George F, Panicot-Dubois L, Dubois C. Inhibition of platelet activation prevents the P-selectin and integrin-dependent accumulation of cancer cell microparticles and reduces tumor growth and metastasis in vivo. *Int J Cancer*. 15 janv 2015;136(2):462-75.
144. Agouni A, Ducluzeau PH, Benameur T, Faure S, Sladkova M, Duluc L, et al. Microparticles from patients with metabolic syndrome induce vascular hypo-reactivity via Fas/Fas-ligand pathway in mice. *PloS One*. 2011;6(11):e27809.

145. Al-Nedawi K, Meehan B, Micallef J, Lhotak V, May L, Guha A, et al. Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat Cell Biol.* mai 2008;10(5):619-24.
146. Lunavat TR, Cheng L, Kim DK, Bhadury J, Jang SC, Lässer C, et al. Small RNA deep sequencing discriminates subsets of extracellular vesicles released by melanoma cells--Evidence of unique microRNA cargos. *RNA Biol.* 2015;12(8):810-23.
147. Weerheim AM, Kolb AM, Sturk A, Nieuwland R. Phospholipid composition of cell-derived microparticles determined by one-dimensional high-performance thin-layer chromatography. *Anal Biochem.* 15 mars 2002;302(2):191-8.
148. Zarovni N, Corrado A, Guazzi P, Zocco D, Lari E, Radano G, et al. Integrated isolation and quantitative analysis of exosome shuttled proteins and nucleic acids using immunocapture approaches. *Methods San Diego Calif.* 1 oct 2015;87:46-58.
149. Zhang M, Jin K, Gao L, Zhang Z, Li F, Zhou F, et al. Methods and Technologies for Exosome Isolation and Characterization. *Small Methods.* 2018;2(9):1800021.
150. Zaborowski MP, Balaj L, Breakefield XO, Lai CP. Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study. *Bioscience.* 1 août 2015;65(8):783-97.
151. Livshits MA, Khomyakova E, Evtushenko EG, Lazarev VN, Kulemin NA, Semina SE, et al. Isolation of exosomes by differential centrifugation: Theoretical analysis of a commonly used protocol. *Sci Rep.* 30 nov 2015;5:17319.
152. Zeringer E, Barta T, Li M, Vlassov AV. Strategies for Isolation of Exosomes. *Cold Spring Harb Protoc.* 1 avr 2015;2015(4):pdb.top074476.
153. Cvjetkovic A, Lötvall J, Lässer C. The influence of rotor type and centrifugation time on the yield and purity of extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles.* 2014;3.
154. Li P, Kaslan M, Lee SH, Yao J, Gao Z. Progress in Exosome Isolation Techniques. *Theranostics.* 2017;7(3):789-804.
155. Yáñez-Mó M, Siljander PRM, Andreu Z, Zavec AB, Borràs FE, Buzas EI, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles.* 2015;4:27066.
156. Dragovic RA, Gardiner C, Brooks AS, Tannetta DS, Ferguson DJP, Hole P, et al. Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med.* déc 2011;7(6):780-8.

157. Doyle LM, Wang MZ. Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells*. 15 juill 2019;8(7):727.
158. Filipe V, Have A, Jiskoot W. Critical evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates. *Pharm Res*. mai 2010;27(5):796-810.
159. Palmieri V, Lucchetti D, Gatto I, Maiorana A, Marcantoni M, Maulucci G, et al. Dynamic light scattering for the characterization and counting of extracellular vesicles: a powerful noninvasive tool. *J Nanoparticle Res*. 5 août 2014;16(9):2583.
160. Wu Y, Deng W, Klinke DJ. Exosomes: improved methods to characterize their morphology, RNA content, and surface protein biomarkers. *The Analyst*. 7 oct 2015;140(19):6631-42.
161. Szatanek R, Baj-Krzyworzeka M, Zimoch J, Lekka M, Siedlar M, Baran J. The Methods of Choice for Extracellular Vesicles (EVs) Characterization. *Int J Mol Sci*. 29 mai 2017;18(6):1153.
162. Gallagher S, Winston SE, Fuller SA, Hurrell JGR. Immunoblotting and immunodetection. *Curr Protoc Mol Biol*. juill 2008;Chapter 10:Unit 10.8.
163. Schey KL, Luther JM, Rose KL. Proteomics characterization of exosome cargo. *Methods San Diego Calif*. 1 oct 2015;87:75-82.
164. Mallocci M, Perdomo L, Veerasamy M, Andriantsitohaina R, Simard G, Martínez MC. Extracellular Vesicles: Mechanisms in Human Health and Disease. *Antioxid Redox Signal*. 1 févr 2019;30(6):813-56.
165. Mathieu M, Martin-Jaular L, Lavieu G, Lavieu G, Théry C. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nat Cell Biol*. 1 janv 2019;21(1):9-17.
166. Le Lay S, Martinez MC, Andriantsitohaina R. Vésicules extracellulaires, biomarqueurs et bioeffecteurs du syndrome métabolique. *médecine/sciences*. 1 nov 2018;34(11):936-43.
167. Mulcahy LA, Pink RC, Carter DRF. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J Extracell Vesicles*. 2014;3.
168. Pedersen BK, Febbraio MA. Muscle as an Endocrine Organ: Focus on Muscle-Derived Interleukin-6. *Physiol Rev*. oct 2008;88(4):1379-406.
169. Forterre A, Jalabert A, Berger E, Baudet M, Chikh K, Errazuriz E, et al. Proteomic Analysis of C2C12 Myoblast and Myotube Exosome-Like Vesicles: A New Paradigm for Myoblast-Myotube Cross Talk? *PLOS ONE*. 2 janv 2014;9(1):e84153.

170. Tanaka S, Terada K, Nohno T. Canonical Wnt signaling is involved in switching from cell proliferation to myogenic differentiation of mouse myoblast cells. *J Mol Signal*. 5 oct 2011;6:12.
171. Forterre A, Jalabert A, Chikh K, Pesenti S, Euthine V, Granjon A, et al. Myotube-derived exosomal miRNAs downregulate Sirtuin1 in myoblasts during muscle cell differentiation. <http://dx.doi.org/104161/cc26808>. 1 janv 2013;13(1):78-89.
172. Aswad H, Jalabert A, Rome S. Depleting extracellular vesicles from fetal bovine serum alters proliferation and differentiation of skeletal muscle cells in vitro. *BMC Biotechnol*. 2 avr 2016;16(1).
173. Guescini M, Maggio S, Ceccaroli P, Battistelli M, Annibalini G, Piccoli G, et al. Extracellular Vesicles Released by Oxidatively Injured or Intact C2C12 Myotubes Promote Distinct Responses Converging toward Myogenesis. *Int J Mol Sci*. 22 nov 2017;18(11):2488.
174. Kim S, Lee MJ, Choi JY, Park DH, Kwak HB, Sohee M, et al. Roles of Exosome-Like Vesicles Released from Inflammatory C2C12 Myotubes: Regulation of Myocyte Differentiation and Myokine Expression. *Cell Physiol Biochem*. 9 août 2018;48:1829-42.
175. Aswad H, Forterre A, Wiklander OPB, Vial G, Danty-Berger E, Jalabert A, et al. Exosomes participate in the alteration of muscle homeostasis during lipid-induced insulin resistance in mice. *Diabetologia*. 30 juill 2014;57(10):2155-64.
176. Frühbeis C, Helmig S, Tug S, Simon P, Krämer-Albers EM. Physical exercise induces rapid release of small extracellular vesicles into the circulation. *J Extracell Vesicles* [Internet]. 2015 [cité 11 nov 2022];4(1). Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26142461/>
177. Guescini M, Canonico B, Lucertini F, Maggio S, Annibalini G, Barbieri E, et al. Muscle Releases Alpha-Sarcoglycan Positive Extracellular Vesicles Carrying miRNAs in the Bloodstream. *PLoS ONE*. 8 mai 2015;10.
178. Bydak B, Pierdoná TM, Seif S, Sidhom K, Obi PO, Labouta HI, et al. Characterizing Extracellular Vesicles and Particles Derived from Skeletal Muscle Myoblasts and Myotubes and the Effect of Acute Contractile Activity. *Membranes* [Internet]. 1 mai 2022 [cité 10 nov 2022];12(5). Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35629791/>
179. Pierdoná TM, Martin A, Obi PO, Seif S, Bydak B, Labouta HI, et al. Extracellular Vesicles as Predictors of Individual Response to Exercise Training in Youth Living with Obesity. *Front Biosci Landmark Ed* [Internet]. 2022 [cité 10 nov 2022];27(5). Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35638410/>

180. Brahmer A, Neuberger E, Esch-Heisser L, Haller N, Jorgensen MM, Baek R, et al. Platelets, endothelial cells and leukocytes contribute to the exercise-triggered release of extracellular vesicles into the circulation. *J Extracell Vesicles*. 28 déc 2019;8(1).
181. Watanabe S, Sudo Y, Makino T, Kimura S, Tomita K, Noguchi M, et al. Skeletal muscle releases extracellular vesicles with distinct protein and microRNA signatures that function in the muscle microenvironment. *PNAS Nexus*. 1 sept 2022;1(4).
182. Deng ZB, Poliakov A, Hardy RW, Clements R, Liu C, Liu Y, et al. Adipose tissue exosome-like vesicles mediate activation of macrophage-induced insulin resistance. *Diabetes*. nov 2009;58(11):2498-505.
183. Kranendonk MEG, de Kleijn DPV, Kalkhoven E, Kanhai DA, Uiterwaal CSPM, van der Graaf Y, et al. Extracellular vesicle markers in relation to obesity and metabolic complications in patients with manifest cardiovascular disease. *Cardiovasc Diabetol*. 5 févr 2014;13:37.
184. Patra D, Ramprasad P, Sharma S, Dey U, Kumar V, Singh S, et al. Adipose tissue macrophage-derived microRNA-210-3p disrupts systemic insulin sensitivity by silencing GLUT4 in obesity. *J Biol Chem*. juin 2024;300(6):107328.
185. Yu Y, Du H, Wei S, Feng L, Li J, Yao F, et al. Adipocyte-Derived Exosomal MiR-27a Induces Insulin Resistance in Skeletal Muscle Through Repression of PPAR $\gamma$ . *Theranostics*. 2018;8(8):2171-88.
186. Katayama M, Wiklander OPB, Fritz T, Caidahl K, El-Andaloussi S, Zierath JR, et al. Circulating Exosomal miR-20b-5p Is Elevated in Type 2 Diabetes and Could Impair Insulin Action in Human Skeletal Muscle. *Diabetes*. mars 2019;68(3):515-26.
187. Wang L, Li X, Wu J, Tang Q. Pancreatic Cancer-Derived Exosomal miR-Let-7b-5p Stimulates Insulin Resistance in Skeletal Muscle Cells Through RNF20/STAT3/FOXO1 Axis Regulation. *Diabetes Metab Syndr Obes Targets Ther*. 2023;16:3133-45.
188. Pitzer CR, Paez HG, Ferrandi PJ, Mohamed JS, Alway SE. Extracellular vesicles from obese and diabetic mouse plasma alter C2C12 myotube glucose uptake and gene expression. *Physiol Rep*. janv 2024;12(1):e15898.
189. Jalabert A, Vial G, Guay C, Wiklander OPB, Nordin JZ, Aswad H, et al. Exosome-like vesicles released from lipid-induced insulin-resistant muscles modulate gene expression and proliferation of beta recipient cells in mice. *Diabetologia*. mai 2016;59(5):1049-58.
190. Aas V, Øvstebø R, Brusletto BS, Aspelin T, Trøseid AMS, Qureshi S, et al. Distinct microRNA and protein profiles of extracellular vesicles secreted from myotubes from morbidly obese donors with type 2 diabetes in response to electrical pulse stimulation. *Front Physiol*. 2023;14:1143966.

191. Rome S. Muscle and Adipose Tissue Communicate with Extracellular Vesicles. *Int J Mol Sci.* 24 juin 2022;23(13):7052.
192. Aguer C, Mercier J, Kitzmann M. Lipid content and response to insulin are not invariably linked in human muscle cells. *Mol Cell Endocrinol.* 5 févr 2010;315(1-2):225-32.
193. Aguer C, Gambarotta D, Mailloux RJ, Moffat C, Dent R, McPherson R, et al. Galactose enhances oxidative metabolism and reveals mitochondrial dysfunction in human primary muscle cells. *PLoS One.* 2011;6(12):e28536.
194. Aguer C, Pasqua M, Thrush AB, Moffat C, McBurney M, Jardine K, et al. Increased proton leak and SOD2 expression in myotubes from obese non-diabetic subjects with a family history of type 2 diabetes. *Biochim Biophys Acta.* oct 2013;1832(10):1624-33.
195. Pedersen BK, Brandt C. The role of exercise-induced myokines in muscle homeostasis and the defense against chronic diseases. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010.
196. Urzi O, Olofsson Bagge R, Crescitelli R. The dark side of foetal bovine serum in extracellular vesicle studies. *J Extracell Vesicles.* oct 2022;11(10):e12271.
197. TR0049-Acetone-precipitation.pdf [Internet]. [cité 12 mai 2025]. Disponible sur: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/Application-Notes/TR0049-Acetone-precipitation.pdf>
198. Webber J, Clayton A. How pure are your vesicles? *J Extracell Vesicles.* 2013;2.
199. Jeppesen DK, Fenix AM, Franklin JL, Higginbotham JN, Zhang Q, Zimmerman LJ, et al. Reassessment of Exosome Composition. *Cell.* 4 avr 2019;177(2):428-445.e18.
200. Livshits MA, Khomyakova E, Evtushenko EG, Lazarev VN, Kulemin NA, Semina SE, et al. Isolation of exosomes by differential centrifugation: Theoretical analysis of a commonly used protocol. *Sci Rep.* 30 nov 2015;5:17319.
201. Lobb RJ, Becker M, Wen SW, Wong CSF, Wiegmanns AP, Leimgruber A, et al. Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma. *J Extracell Vesicles.* 2015;4:27031.
202. Koliha N, Wiencek Y, Heider U, Jüngst C, Kladt N, Krauthäuser S, et al. A novel multiplex bead-based platform highlights the diversity of extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles.* 2016;5:29975.
203. Sódar BW, Kittel Á, Pálóczi K, Vukman KV, Osteikoetxea X, Szabó-Taylor K, et al. Low-density lipoprotein mimics blood plasma-derived exosomes and microvesicles during isolation and detection. *Sci Rep.* 18 avr 2016;6:24316.

204. Livshits MA, Khomyakova E, Evtushenko EG, Lazarev VN, Kulemin NA, Semina SE, et al. Isolation of exosomes by differential centrifugation: Theoretical analysis of a commonly used protocol. *Sci Rep.* 30 nov 2015;5:17319.
205. Crewe C, Joffin N, Rutkowski JM, Kim M, Zhang F, Towler DA, et al. An Endothelial-to-Adipocyte Extracellular Vesicle Axis Governed by Metabolic State. *Cell.* 18 oct 2018;175(3):695-708.e13.
206. Freeman DW, Noren Hooten N, Eitan E, Green J, Mode NA, Bodogai M, et al. Altered Extracellular Vesicle Concentration, Cargo, and Function in Diabetes. *Diabetes.* nov 2018;67(11):2377-88.
207. Zhao W, Li X, Li X, Peng L, Li Y, Du Y, et al. Significant increase of serum extracellular vesicle-packaged growth differentiation factor 15 in type 2 diabetes mellitus: a cross-sectional study. *Eur J Med Res.* 19 janv 2023;28:37.
208. French SL, Butov KR, Allaeyes I, Canas J, Morad G, Davenport P, et al. Platelet-derived extracellular vesicles infiltrate and modify the bone marrow during inflammation. *Blood Adv.* 2 juill 2020;4(13):3011-23.
209. Zhang M, Wang L, Chen Z. Research progress of extracellular vesicles in type 2 diabetes and its complications. *Diabet Med J Br Diabet Assoc.* sept 2022;39(9):e14865.

## ANNEXES

**Tableau A. Critères d'inclusions**

	<b>Sains</b>	<b>Obèses</b>	<b>DT2</b>
Sexe	Homme et Femme	Homme et Femme	Homme et Femme
Age (années)	40-65	40-65	40-65
Indice de masse corporelle (IMC) (kg/m <sup>2</sup> )	20-25	≥30	≥30
Statut diabétique	Non diabétique	Non diabétique	Diabétique type 2
Glycémie à jeun	≤1,1	≤1,1	≥1,26
Hémoglobine glycosylé (HbA1C) (%)	≤6	≤6±	6,5-9,9
HOMA-IR	<2	<2	≥2,5
Catégorie IPAQ	1	1	1
Marche quotidienne	≤8000	≤8000	≤8000

**DT2 : diabète de type 2. Statut de DT2 déterminé par un médecin selon les critères de Diabète Canada. HOMA-IR : Évaluation du modèle homéostatique pour la résistance à l'insuline = [glucose à jeun (mM) x insuline à jeun (mU/L)] / 22.5. IPAQ : Questionnaires internationaux sur l'activité physique. La catégorie 1 correspond à de faibles niveaux d'activité physique, c'est-à-dire moins d'une demi-heure d'activité physique modérée par jour la plupart des jours.**

**Tableau B. Caractéristiques des participants recrutés par notre étude pilote**

	Sains	Obèse	DT2	p-value (one-way ANOVA)
n (males/femelles)	9(3/6)	15(8/7)	8(0/8)	-
Age (années)	54±2,9	51±2,0	57±2,7	0,258
Indice de masse corporelle (IMC) (kg/m <sup>2</sup> )	24,1±0,5	35,1±1,0 <sup>***</sup>	35,0±2,1 <sup>***</sup>	<0,0001
% masse grasseuse	27,9±	37,0±2,5 <sup>**</sup>	44,1±1,2 <sup>***</sup>	0,0011
Circonférence de taille	82,9±2,5	109,5±3,0 <sup>***</sup>	108,3±2,9 <sup>***</sup>	<0,0001
Hémoglobine glycosylé (HbA1C) (%)	5,5±0,1	5,4±0,1	7,4±0,5 <sup>***, \$\$\$</sup>	<0,0001

**T2D : diabète de type 2. % masse grasse a été mesurée par impédance bioélectrique. \*\* : p<0,01, \*\*\* : p<0,0001 comparé à sain ; \$\$\$p<0,0001 comparé à obèse ; Fisher PLSD test post-hoc.**