



HAL
open science

Rôle de l'IGF-1 dans la plasticité corticale et l'altération de la performance motrice induite par l'hypodynamie-hypokinésie

Julien Mysoet

► To cite this version:

Julien Mysoet. Rôle de l'IGF-1 dans la plasticité corticale et l'altération de la performance motrice induite par l'hypodynamie-hypokinésie. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2015. Français. NNT : 2015LIL2S026 . tel-01279604

HAL Id: tel-01279604

<https://theses.hal.science/tel-01279604>

Submitted on 26 Feb 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE LILLE – NORD DE FRANCE
UNIVERSITE DE LILLE 2 : DROIT ET SANTE

THESE

Présentée par

Julien MYSOET

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE

SPECIALITE : NEUROSCIENCES

ROLE DE L'IGF-1 DANS LA PLASTICITE CORTICALE ET L'ALTERATION DE LA PERFORMANCE MOTRICE INDUITE PAR L'HYPODYNAMIE-HYPOKINESIE

Soutenue le 30 septembre 2015 devant le jury composé de :

Mme Christine MARIE , Professeure, Université de Bourgogne	Rapporteur
Mme Valentine BOUET , Maitre de Conférences, Université de Caen	Rapporteur
Mme Odile VILTART , Maitre de Conférences, Université de Lille	Examineur
M Jacques-Olivier COQ , Chargé de Recherche CNRS, Marseille	Examineur
M Bruno BASTIDE , Professeur, Université de Lille,	Examineur
Mme Marie-Hélène CANU , Professeure, Université de Lille,	Directeur de Thèse

Travail réalisé au sein de l'équipe 1 de l'Unité de Recherche Pluridisciplinaire Sport, Santé, Société.

*« On fait la science avec des faits,
comme on fait une maison avec des pierres,
mais une accumulation de faits n'est pas plus une science
qu'un tas de pierres n'est une maison. »*

Henri Poincaré
Hypotheses in Nature

*A mes grands-parents, Pierrette et Claude,
A mes parents, Claudine et Xavier,
A mon frère, Justin,
A Elodie,
Sans qui cela n'aurait pas été possible.*

REMERCIEMENTS

Avant toute chose, je tiens à remercier profondément les membres de mon jury, le Pr. **Christine Marie**, le Dr. **Valentine Bouet**, le Dr. **Odile Viltart**, le Dr. **Jacques-Olivier Coq**, le Pr. **Bruno Bastide** et le Pr. **Marie-Hélène Canu** pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant de faire partie de mon jury et d'examiner mes travaux. Je tenais également à remercier particulièrement le Pr. **Christine Marie** et le Dr. **Valentine Bouet** pour avoir accepté d'étudier ce manuscrit et d'être rapporteurs de cette thèse.

Je remercie également le Pr. **Serge Berthoin**, directeur de l'EA 7369, Unité de Recherche Pluridisciplinaire Sport, Santé, Société, pour m'avoir permis de réaliser ces travaux au sein du laboratoire, pour son accessibilité et son amabilité.

Mes remerciements vont aussi au Pr. **Bruno Bastide**, co-directeur de l'unité, pour m'avoir accepté au sein du site Lille 1 depuis ma première année de Master et pour l'intérêt, constant et pertinent, qu'il a porté sur mon projet pendant ces trois années de thèse.

Ma plus sincère gratitude, mes remerciements et mon plus grand respect vont au Pr **Marie-Hélène Canu** qui m'a encadré pendant plus de 4 ans si l'on compte les années de Master. Je vous remercie pour votre patience (votre grande patience) face à mon caractère pas forcément très facile, et pour votre disponibilité dans les bons comme les mauvais jours. Vous m'avez tellement appris, en ces trois ans, tant au niveau théorique qu'expérimental mais aussi en terme de rigueur scientifique, d'écriture (et je pars de loin...) et de pédagogie. Même si tout ne fut pas facile, soyez assurée de ma reconnaissance et de mon amitié. Comme quoi, prier Sainte Rita ne fut pas une mauvaise idée !

Je souhaite aussi remercier le Dr **Erwan Dupont** pour m'avoir co-encadré pendant ces années. Je te remercie pour ta sympathie, ta présence et ton esprit critique qui ont en partie façonné ces études. Ma plus grande fierté fut, qu'au bout de trois ans de thèse, mes figures soient, enfin, à tes goûts !

Mon amitié va au Dr **Caroline Cieniewski-Bernard**. Merci pour les cookies ! Plus sérieusement, je te remercie pour tes conseils tant techniques que fondamentaux, pour ton soutien et l'intérêt que tu portas à ce sujet (bien qu'axé « cerveau ») pendant ces années.

Mes profonds remerciements vont, encore une fois, au Dr. **Odile Viltart** et au Dr. **Jacques-Olivier Coq** pour avoir accepté de faire partie de mon Comité de Suivi de Thèse, pour leur bienveillance et l'intérêt qu'ils portèrent autant au sujet qu'à moi-même. Je vous remercie pour vos conseils précieux et vos remarques pertinentes qui ont ponctué ce doctorat.

Ensuite, je tiens à remercier le Dr **Cyril Garnier** et **Christophe Gillet** pour m'avoir permis de réaliser les études cinématiques et leur aide concernant les résultats présentés dans ces travaux.

Je remercie globalement la dream team des étudiants du labo, les futurs prix Nobel, à savoir **Matthias Lambert** alias « Le King », **Barbara Deracinois** alias « Barbie », **Julie Fourneau** alias « Pipou », **Samir Bensaid** alias « Chouquette » et **Amandine Girard** Alias « Licorne ». Merci pour votre présence, votre bonne humeur, les rires et les bons moments passés en votre présence. Comme disais Matthias « ils deviennent de jour en jour un peu plus que des collègues de travail ». Et bon courage à tous ! Matthias, pour ta dernière année, comme tu as pu le voir, c'est que du plaisir et bonne chance pour la suite. Samir et Julie pour les trois années qui arrivent, le plus dur est à venir mais vous en êtes capables ! Amandine pour le reste de la route ! Comme toujours « ça va aller ! ».

Je tiens à remercier également tout le reste de l'équipe 1 de l'UREPSSS, les techniciennes **Laetitia** (et sa « bonne » humeur) et **Valérie** (notre vénérable maitre zen), notre secrétaire de choc **Emilie** (qui s'est fait sa place en peu de temps), **Fabrice** (et ses jolies chemises), le Dr **Luc Danhoffer** (et ses goûts musicaux douteux), le Dr **Laurence Stevens** et le Dr **Florence Piquet**. A défaut de silence propice à l'étude, vous amenez une convivialité et une bonne humeur qu'il me fut agréable de partager pendant ces trois ans. Bon déménagement et bon courage dans les nouveaux locaux !

Je remercie le personnel de l'animalerie de Lille 1 **Serge** et **Nathalie** pour leur contribution dans l'hébergement des rats qui furent la base de nos travaux.

Mes remerciements vont également à **Jessica** et **Arnaud**, le staff du SN1 qui étaient toujours présents lors des longues après-midi d'enseignements, et qui m'apportaient un petit café quand ça devenait dur.

Je tiens également à remercier **Elodie**, **ma famille** et tous mes amis qui m'ont soutenu pendant ces années (et qui ne liront peut être jamais ces lignes). **Carl**, **Benoit**, **Stéphane**, **Gregory**, **François**, **Abbas**, **Nicolas**, **Cindy**, **Eléonore**, **Adrien** et **tous ceux** que je ne cite pas car la liste serait trop longue. Merci à tous ceux qui ont dû subir mes monologues interminables quand je parlais, avec passion (bien que pas forcément partagée), de mes travaux. Merci à vous.

Enfin, je remercie le ministère de la recherche et de l'enseignement supérieur pour avoir financé mes trois années de thèse.

TABLE DES MATIERES

Table des matières	1
Liste des abréviations	4
Liste des illustrations	5
Résumé	7
Introduction générale	9
Partie 1 Revue Bibliographique	14
I. Organisation du système sensorimoteur	15
A. Le système somesthésique	15
1. Les mécanorécepteurs cutanés	16
2. Les récepteurs proprioceptifs	18
3. Innervation et moelle épinière	19
4. Les voies de la somesthésie	20
a. La voie des colonnes dorsales	20
b. La voie spinothalamique	21
5. Le thalamus somesthésique.....	22
6. Le cortex somesthésique	22
a. Organisation anatomique.....	22
b. Organisation somatotopique	23
B. Le système moteur	24
1. Le muscle et l'unité motrice.....	25
2. La moelle épinière.....	26
3. Contrôle de l'activité des motoneurons	27
a. Les voies motrices ayant pour origine le tronc cérébral.....	28
b. Les voies motrices ayant pour origine le cortex	29
4. Le cortex moteur.....	30
a. Organisation anatomique.....	30
b. Organisation fonctionnelle.....	31
II. <i>Insulin-like Growth Factor-1</i> (IGF-1)	32
A. Historique	32
B. Régulation de l'IGF-1	32
1. Structure de l'IGF-1	32

2.	Sécrétion d'IGF-1.....	33
3.	<i>Insulin-like growth factor binding proteins</i> (IGFBPs)	35
4.	Les neuropeptides dérivés de l'IGF-1.....	39
5.	Récepteur à l'IGF-1 et voies de signalisation	40
C.	IGF-1 au niveau cérébral	42
1.	Entrée dans le système nerveux central	43
a.	Passage de la barrière hématoencéphalique (BHE).....	43
b.	Passage de la barrière hémato-cérébro-spinale	43
2.	Effets de l'IGF-1 sur le cerveau	45
a.	Effets de l'IGF-1 sur le développement.....	45
b.	Effets de l'IGF-1 au niveau cellulaire	45
c.	Effets de l'IGF-1 sur l'angiogenèse	46
d.	Effets de l'IGF-1 sur les capacités cognitives.....	47
3.	Interactions de l'IGF-1 avec les neurotrophines.....	48
D.	IGF-1 et exercice physique	50
1.	Effets de l'exercice sur les taux d'IGF-1	50
2.	Effets bénéfiques de l'exercice sur le cerveau.....	51
III.	L'hypodynamie-hypokinésie	53
A.	Définition	53
1.	Les situations d'HH chez l'humain	53
2.	Les modèles humains d'hypodynamie-hypokinésie	54
a.	L'alitement prolongé	54
b.	L'immersion sèche.....	54
c.	La suspension d'un membre	54
3.	Les modèles animaux.....	55
a.	Elévation du train postérieur	55
b.	Immobilisation.....	55
c.	Contention.....	55
B.	Effets de l'HH sur le système sensorimoteur	55
1.	Muscle et HH.....	56
2.	Nerf, moelle épinière, et HH	57
3.	Réflexe et HH.....	58
4.	Activité posturale et HH	59
5.	Locomotion et HH	60
6.	Cortex cérébral et HH.....	64

a. Cortex moteur primaire	64
b. Cortex somesthésique primaire	66
c. Mécanismes impliqués dans la plasticité corticale	66
C. Effets de l'HH sur l'IGF-1	68
Partie 2 Travaux expérimentaux.....	69
I. Etude des effets de l'HH sur la voie de signalisation de l'IGF-1 dans différentes structures impliquées dans la performance motrice	70
A. Introduction	70
B. Matériel et méthodes	71
1. Animaux et traitements	71
2. Expérimentations	71
C. Principaux résultats	72
D. Résultats complémentaires	74
E. Article	75
II. Etude des effets d'une administration corticale d'IGF-1 sur la plasticité corticale, et conséquences comportementales	76
A. Introduction	76
B. Animaux et traitements	77
C. Etude des effets de l'IGF-1 sur le cortex somesthésique et la sensibilité tactile	78
1. Expérimentations	78
2. Principaux résultats.....	79
D. Etude des effets de l'IGF-1 sur le cortex moteur et la performance motrice	80
1. Expérimentations	80
2. Principaux résultats.....	81
E. Résultats complémentaires	82
1. Test de l'adhésif	82
2. Analyse cinématique	84
F. Conclusion	94
G. Articles	94
Partie 3 Discussion générale.....	95
Références bibliographiques	111

LISTE DES ABREVIATIONS

AKT : PKB : protein kinase B
ALS : acid-labile subunit
AMPA : acide α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic
AP-5 : acide 2-amino-5-phosphonoalérique
BDNF : brain derived neurotrophic factor
BHE : barrière hématoencéphalique
CPG : central pattern generator
EET : acide 11,12-époxyéicosatriénoïque
FAK : focal adhesion kinase
FGF-2 : fibroblast growth factor 2
FMT : functional mobility test
GABA : acide γ -aminobutyrique
GH : hormone de croissance
GHRH : growth hormone releasing hormone
GLUT4 : glucose Transporter type 4
GSK3 β : glycogen synthase kinase 3 β
HH : hypodynamie-hypokinésie
IGF-1 : insulin-like growth factor 1
IGF-1R : récepteur à l'IGF-1
IGFBP : Insulin-like growth factor binding proteins
IRS : insulin receptor substrate
JAK : janus kinase
LRP1 : low density lipoprotein receptor-related protein 1
LRP2 : low density lipoprotein receptor-related protein 2
MAPK : mitogen-activated protein kinase
MEK : mitogen signal-regulated kinase
MMP9 : matrix metallopeptidase 9
NGF : nerve growth factor
NMDA : acide N-méthyl-D-aspartique
NSILA : non suppressible insuline-like activity
PGE2 : prostaglandine E2
PI3K : phosphatidylinositol 3-kinase
PKC : protein kinase C
RACK1 : ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
Shc : src homology and collagen domain protein
SOT : sensory organization test
SS : somatostatine
STAT : signal transducers and activators of transcription
VEGF : vascular endothelial growth factor
VPL : noyau ventro-postéro-latéral du thalamus
VPM : noyau ventro-postéro-médian

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Représentation schématique des mécanorécepteurs cutanés chez le rat.....	17
Figure 2 : Innervation de la patte postérieure de rat par les nerfs sciatique et saphène	19
Figure 3 : Représentation schématique d'une coupe de moelle épinière au niveau de la racine L4	20
Figure 4 : Représentation schématique des voies somesthésiques chez le rat	21
Figure 5 : Organisation somatotopique du cortex somesthésique du rat.....	24
Figure 6 : Représentation schématique de la « voie finale commune »	27
Figure 7 : Représentation des voies motrices issues du tronc cérébral chez le rat.....	29
Figure 8 : Représentation schématique de la voie motrice corticospinale directe.....	30
Figure 9 : Organisation somatotopique du cortex moteur du rat	31
Figure 10 : Séquence d'acides aminés de l'IGF-1 et de l'insuline	33
Figure 11 : Représentation de l'axe GH/IGF-1	35
Figure 12 : Structure et fonction des IGFBPs	37
Figure 13 : Schéma du récepteur à l'IGF-1.....	40
Figure 14 : Voies de signalisation de l'IGF-1R	41
Figure 15 : Distribution des IGF-1R dans le cerveau chez le rat adulte	42
Figure 16 : Mécanismes d'entrée de l'IGF-1 périphérique dans le cerveau	44
Figure 17 : Modèles d'interactions entre l'IGF-1 et d'autres neurotrophines	49
Figure 18 : Organisation du système locomoteur.....	61
Figure 19 : Effets de l'HH sur le mouvement de la patte postérieure d'un rat	64
Figure 20 : Présence de cellules immunoréactives à l'IGF-1 dans le cortex sensorimoteur ...	73
Figure 21 : Evolution des taux plasmatiques de corticostérone au cours de l'HH	74

Figure 22 : Effets de l'HH et/ou de l'IGF-1 sur la réponse au test de l'adhésif.....	83
Figure 23 : Paramètres analysés lors de l'étude cinématique de la marche du rat	86
Figure 24 : Distance de rétraction et protraction des pattes antérieures et postérieures	87
Figure 25 : Analyse spatiale et de la coordination entre les membres du rat.....	89
Figure 26 : Variations angulaires des différentes articulations par rapport au groupe Contrôle.....	92
Figure 27 : Synthèse des effets de l'HH et de l'IGF-1 dans la réorganisation corticale et la dégradation de la performance sensorimotrice induites par l'HH.	97
Tableau 1 : Propriétés des différents types de fibres musculaires.....	25
Tableau 2 : Analyse des variations angulaires de la cheville, du genou et de la hanche du rat.	91
Tableau 3 : Tableau récapitulatif des effets de l'HH sur le cortex sensorimoteur, et de ses mécanismes.....	100

RESUME

L'hypodynamie-hypokinésie est une situation correspondant à une diminution de l'activité motrice (hypokinésie) couplée à une diminution des charges corporelles (hypodynamie). Chez l'homme, cette situation est retrouvée lors de situations qui limitent la mobilité (immobilisation, alitement prolongé...), lors d'un séjour en microgravité, ou plus simplement chez des individus sédentaires et/ou très âgés. L'hypodynamie-hypokinésie entraîne une sévère altération de la performance motrice, notamment de l'équilibre, de la posture et de la locomotion. Cette altération est due à une dégradation du système musculaire (atrophie, changements phénotypiques, perte de force, fatigabilité), mais également à une modification des propriétés fonctionnelles du cortex sensorimoteur (réorganisation des cartes somatotopiques, changements d'excitabilité, modifications morphologiques). Si l'altération du système musculaire est bien décrite dans la littérature, les mécanismes impliqués dans la plasticité corticale sont complexes et seulement partiellement élucidés. Une meilleure compréhension des systèmes mis en jeu dans l'hypodynamie-hypokinésie permettrait de développer des stratégies de prévention et/ou de récupération chez les personnes confrontées à cette situation. Dans cette optique, les recherches du laboratoire portent sur un modèle animal qui consiste en l'élévation du train postérieur du rat pendant 14 jours. Ainsi, les charges corporelles, s'exerçant habituellement sur les membres postérieurs, sont absentes et l'activité musculaire limitée. Ce modèle animal d'hypoactivité reproduit la plupart des effets de l'hypodynamie-hypokinésie décrits chez l'homme.

L'objectif de cette étude a été d'explorer les mécanismes de la réorganisation corticale induite par l'hypodynamie-hypokinésie. Notre intérêt s'est plus particulièrement porté sur l'insulin-like growth factor 1 (IGF-1), une protéine ubiquitaire possédant de nombreux rôles au niveau cérébral. En effet, en se fixant à son récepteur, l'IGF-1, parmi une multitude de phénomènes, stimule l'angiogenèse, la neurogenèse, et participe à la plasticité synaptique. De plus, il est décrit comme étant un acteur central des effets bénéfiques de l'exercice physique au niveau cérébral.

Aussi, dans un premier temps, nous avons déterminé les effets de cette hypoactivité sur le système IGF-1 et les voies de signalisation associées dans plusieurs structures impliquées dans la régulation de la performance motrice (cortex sensorimoteur, striatum, cervelet). Nos résultats montrent une sévère diminution des taux d'IGF-1 et de l'activation de la voie PI3K-AKT, et ce spécifiquement dans le cortex sensorimoteur.

Dans un second temps, nous avons voulu déterminer si en maintenant les taux corticaux d'IGF-1 pendant toute la durée de l'hypodynamie-hypokinésie, il était possible de prévenir la réorganisation corticale et ses conséquences délétères sur le comportement moteur. Pour cela, dans une première partie, notre étude a porté sur le cortex somesthésique et la sensibilité tactile. Nos résultats montrent que l'IGF-1 prévient partiellement la réorganisation corticale et l'altération de la sensibilité tactile induites par l'hypoactivité. Dans une seconde partie, nous nous sommes intéressés à l'analyse du cortex moteur et de la performance motrice. Il apparaît qu'un maintien des taux corticaux d'IGF-1 prévient en partie l'altération du système moteur retrouvée en situation d'hypodynamie-hypokinésie.

Ainsi, l'ensemble de ces données suggère que la diminution des taux d'IGF-1 observée en condition d'hypoactivité joue un rôle clé dans la réorganisation corticale sensorimotrice. De plus, notre étude montre qu'une prévention, même partielle, de cette réorganisation corticale peut induire une amélioration fonctionnelle de la performance motrice.

INTRODUCTION GENERALE

L'alitement prolongé, l'immobilisation, un séjour en microgravité, ou plus simplement la sédentarité sont des situations ayant en commun une forte réduction de l'activité motrice (hypokinésie) et une diminution de la charge corporelle s'exerçant sur les membres inférieurs (hypodynamie). Toutes ces situations entraînent l'apparition d'une atteinte sévère du système musculaire, qui induit une dégradation de la performance motrice et plus particulièrement de la posture et de la marche. Elles peuvent même conduire à un syndrome d'immobilité qui aura des répercussions sur l'ensemble des fonctions de l'organisme et risque d'entraîner de nombreuses complications.

De nombreuses études réalisées pour les centres d'études spatiales (ESA, CNES, NASA, NASDA) ont cherché à développer des stratégies afin de prévenir les troubles physiologiques inhérents à un séjour en microgravité. Ainsi, l'entraînement constant des spationautes avant et pendant le vol spatial permet de limiter cette dégradation (European space agency, 2011). Toutefois, ces stratégies de prévention ne concernent qu'un faible nombre de personnes et ne sont pas adaptés à un usage médical. En effet, dans le cas d'une immobilisation ou d'un alitement prolongé, la dégradation est variable d'un patient à l'autre : elle sera limitée chez un sujet ayant une activité physique régulière et plus sévère chez un patient sédentaire (Blain et al. 2000 ; Wiggs 2015). De plus, une activité physique pendant la période d'immobilisation est bien souvent, par définition, impossible.

Cette diminution d'activité physique induit une dégradation de la performance motrice et altère la capacité du patient à réaliser les activités quotidiennes, ce qui a pour conséquence une baisse d'activité physique et un auto-entretien du processus. Cette perte d'autonomie peut altérer la vie sociale de l'individu et diminuer sa qualité de vie comme son bien-être. Dans les cas les plus graves, ce processus peut devenir un facteur de risque majeur pour des maladies chroniques, notamment métaboliques telles que l'obésité ou le diabète (Wolfe 2006), ou pour les chutes, qui peuvent générer une nouvelle immobilisation, et de longues périodes de rééducation.

A l'heure actuelle, les protocoles utilisés pour permettre la récupération de la performance motrice (mobilisation active ou passive, entretien musculaire, électrothérapie, vibrations) s'avèrent peu efficaces, parfois douloureux pour les patients, et sont sujets à de nombreuses contre-indications (Dehail et al. 2008 ; English et Paddon-jones 2010 ;

Koukourikos et al. 2014). Ainsi, certains patients n'auront pas accès à ces protocoles, et d'autres n'en tireront que des bénéfices limités. La rééducation sera donc plus longue et le coût de la prise en charge plus élevé. Le développement des stratégies de prévention ou l'amélioration des techniques de récupération fonctionnelle chez des patients soumis à l'hypodynamie-hypokinésie est donc actuellement une problématique majeure, autant sur le plan médical (amélioration de la prise en charge), qu'humain (amélioration de la qualité de vie des patients) ou économique (réduction du coût de la prise en charge). La compréhension des processus délétères induits par une période d'hypoactivité permettrait l'amélioration des méthodes de rééducation menant à une récupération fonctionnelle.

Dès 1960, des travaux se sont intéressés aux conséquences de l'immobilisation, et ont permis de montrer de sévères perturbations de l'ensemble des fonctions physiologiques (respiratoire, nerveuse, cardiovasculaire, musculosquelettique...) (Brower 2009). L'altération du système musculosquelettique et ses mécanismes sont bien décrits dans la littérature. En effet, de nombreuses études ont montré qu'une hypoactivité entraîne une dégradation du système musculaire (atrophie, perte de force...), qui dépend du muscle impliqué et de la durée de l'hypoactivité (pour revue, Fitts et al., 2000). Toutefois, en ce qui concerne le système nerveux, les effets de l'hypoactivité sont encore très mal connus à ce jour. Pourtant, depuis les années 1980 et les travaux de Merzenich (Buonomano et Merzenich 1998), il est admis que le cerveau, même à l'âge adulte, est capable de s'adapter en fonction de l'activité et de l'expérience. La représentation du corps sur le cortex cérébral (somatotopie) varie selon l'activité de chaque partie du corps. Ainsi, l'augmentation de l'activité sensorimotrice d'une partie du corps, comme par exemple jouer du piano ou encore utiliser un smartphone, augmente l'activité de la région corticale liée à cette partie (respectivement les mains ou le pouce) (Gindrat et al., 2015 ; Münte et al., 2002) ; à l'inverse, une baisse d'activité, comme lors d'une immobilisation ou d'un alitement prolongé, entraîne une forte réduction de la surface de représentation du membre impliqué. Cette réorganisation corticale a des conséquences fonctionnelles. En effet, elle est corrélée à des variations de la perception et de la discrimination tactile, de la performance et de l'habileté motrices... Si le lien entre la fonction sensorimotrice et la réorganisation corticale est connue, les mécanismes moléculaires de cette réorganisation restent peu étudiés à ce jour. C'est que j'ai voulu développer dans ces travaux de thèse.

Mon intérêt s'est plus particulièrement porté sur le rôle de l'*insulin like growth factor 1* (IGF-1). Cette molécule ubiquitaire possède de nombreux rôles trophiques chez l'adulte notamment au niveau cérébral. En effet, en se fixant à son récepteur, l'IGF-1 stimule l'angiogenèse, la neurogenèse, induit une plasticité synaptique... De plus, l'IGF-1 semble être le médiateur des effets bénéfiques de l'exercice physique au niveau cérébral. Ainsi, dans le cadre de ce doctorat d'Université, j'ai exploré l'importance de **l'IGF-1 dans les réorganisations corticales induites par cette période d'hypoactivité et les conséquences fonctionnelles sur la performance sensorimotrice.**

La première partie de ce manuscrit est consacrée à une revue de la bibliographie. Le *chapitre I* correspond à une description de l'organisation du système sensorimoteur, du système somesthésique permettant la transmission et le traitement des informations sensorielles jusqu'au cortex moteur impliqué dans la réalisation de la commande motrice. Le *chapitre II* concerne le système IGF-1 et son implication au niveau cérébral. Finalement, le terme d'hypodynamie-hypokinésie est défini dans le *chapitre III*. Plus spécifiquement sont donc détaillées dans ce chapitre les différentes situations induisant une période d'hypoactivité chez l'homme et les différents modèles, humains comme animaux, permettant l'étude de ces phénomènes. Seront exposés, ensuite, les données concernant les effets d'une hypoactivité sur le muscle et le système nerveux, et leurs conséquences fonctionnelles sur la posture et la locomotion.

La seconde partie décrit nos résultats expérimentaux. Elle est divisée en deux chapitres. Pour chacun d'eux, je présenterais un résumé introductif, les groupes d'animaux et les techniques utilisés, les principaux résultats et la conclusion que nous pouvons faire ressortir de ces travaux. De plus, des résultats complémentaires ont été ajoutés à ceux synthétisés dans les articles. Le premier chapitre de cette partie concernera la mise en évidence des effets de l'hypodynamie-hypokinésie sur la voie de signalisation de l'IGF-1 au niveau cérébral. Les résultats relatifs à ces travaux sont exposés dans l'article intitulé « *Hypoactivity affects IGF-1 level and PI3K/AKT signaling pathway in cerebral structures implied in motor control* » publié en 2014 dans PLoS One. Le second chapitre de cette partie est consacré à l'analyse des conséquences corticales et comportementales d'un maintien des taux corticaux d'IGF-1 pendant la durée de l'hypoactivité. Nous nous sommes, dans un premier temps, intéressés au cortex somesthésique et à la sensibilité tactile dans une étude

nommée « *Role of IGF-1 in cortical plasticity and functional deficit induced by sensorimotor restriction* » et publiée en 2015 dans *Behavioral Brain Research*. Notre étude s'est ensuite consacrée à l'analyse du cortex moteur et de la performance motrice. Ces résultats sont compilés dans l'article « *Reorganization of motor cortex and degradation of motor abilities induced by hindlimb unloading are partially prevented by cortical IGF-1 administration* » et soumis à *The Journal of Physiology*.

La troisième partie de ce manuscrit est consacrée à une discussion générale de l'ensemble des travaux réalisés, dans laquelle nous avons tenté d'apporter une analyse critique de notre travail, et à proposer des perspectives.

PARTIE 1

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Organisation du système sensorimoteur

Le terme de « système sensorimoteur » correspond à l'ensemble des systèmes physiologiques impliqués dans la récupération et le traitement des informations sensorielles (système somesthésique), dans la mise en place d'une activité motrice volontaire ou non (système moteur), et dans leurs interactions. Le système somesthésique permet de transformer un stimulus mécanique en un flot organisé d'informations électriques interprétables par le système nerveux. Après intégration et interprétation de ces informations, le système moteur génère un flux d'informations électriques visant l'activation ordonnée du système musculaire.

A. Le système somesthésique

La somesthésie regroupe l'ensemble des informations sensorielles provenant du revêtement cutanéomuqueux, des systèmes musculaires et ostéo-articulaires et des viscères. Ces sensations sont fournies par de nombreux types de récepteurs situés dans ces différents tissus. On distingue trois types de sensibilité : la sensibilité extéroceptive, originaire de la peau, comprenant la sensibilité épicrotique (sensibilité fine et différenciée), la sensibilité protopathique (sensibilité grossière et non discriminative) et la sensibilité thermo-algésique (sensibilité thermique ou douloureuse) ; la sensibilité proprioceptive, correspondant à la perception, consciente ou non, de la position des différentes parties du corps ; et la sensibilité intéroceptive, véhiculant toutes les informations provenant des viscères. Ici, seules les sensibilités extéroceptive et proprioceptive seront abordées. Ces informations sont captées par des récepteurs spécifiques et transformées en signal nerveux. Le message est ensuite conduit par des fibres sensorielles vers la moelle épinière, le tronc cérébral puis le cortex somesthésique qui sera responsable du traitement de cette information.

1. Les mécanorécepteurs cutanés

Il existe plusieurs types de mécanorécepteurs au sein de l'épiderme (Figure 1). Ils sont caractérisés en fonction de leur morphologie, de leur localisation dans le derme et de certaines propriétés liées à leur réponse (Munger et Ide 1988). En effet, chaque récepteur s'adapte plus ou moins vite aux stimuli mécaniques (*slow* ou *fast adaptation*) et possède un champ récepteur caractéristique (champs récepteurs petits [type 1] ou grands [type 2]). Les principaux récepteurs sont :

- **Les disques de Merkel.** Localisés dans la couche superficielle de l'épiderme des peaux glabres comme pileuses, ils sont associés à des cellules spécifiques nommées cellules de Merkel. Les disques de Merkel sont dit « SA1 » (*Slow Adaptation* de type 1), c'est-à-dire qu'ils s'adaptent lentement aux déformations mécaniques et que leur champ récepteur est petit (Leem et al. 1993).

- **Les corpuscules de Meissner.** Ils sont particulièrement présents dans les zones de peau glabres. De type FA1 (*Fast Adaptation* de type 1), ils ont une grande vitesse d'adaptation et un petit champ récepteur. Ces propriétés les rendent très sensibles aux vibrations de faible fréquence (30-50 Hz) (Leem et al. 1993).

- **Les corpuscules de Krause.** Ce sont des mécanorécepteurs retrouvés dans la peau glabre et à adaptation rapide. Ils ont un rôle semblable aux corpuscules de Meissner mais sont plus présents que ces derniers chez le rat (Hamann 1995).

- **Les corpuscules de Ruffini.** Ces récepteurs encapsulés sont localisés profondément dans le derme. Ils ont une forme allongée et sont orientés parallèlement à la surface cutanée. Ils s'adaptent lentement aux stimuli mécaniques, ont de grands champs récepteurs (SA2) et sont connus pour être sensibles aux étirements cutanés (Grigg 1996).

- **Les corpuscules de Pacini.** Ils sont retrouvés eux aussi en profondeur dans le derme et sont associés aux membranes interosseuses. Ils sont caractérisés par une adaptation rapide (FA2), de très grands champs récepteurs et une grande sensibilité à la vibration (Leem et al. 1993).

- **Les récepteurs du follicule pileux.** Présents au niveau du derme pileux, ce sont des extrémités myélinisées de fibres nerveuses dont les propriétés sont spécifiques de la partie du follicule entourée. En effet, les récepteurs les plus superficiels s'adaptent rapidement aux

stimuli mécaniques alors que les fibres entourant le bulbe du follicule pileux sont d'adaptation lente (Millard et Woolf 1988).

- **Les terminaisons nerveuses libres.** Elles sont retrouvées dans les peaux glabres comme pileuses mais aussi dans les muscles, les articulations et les viscères. Ce sont les extrémités terminales de fibres C non myélinisées ou des fibres A δ myélinisées. Elles interviennent comme nocicepteurs ou thermorécepteurs (Hamann 1995).

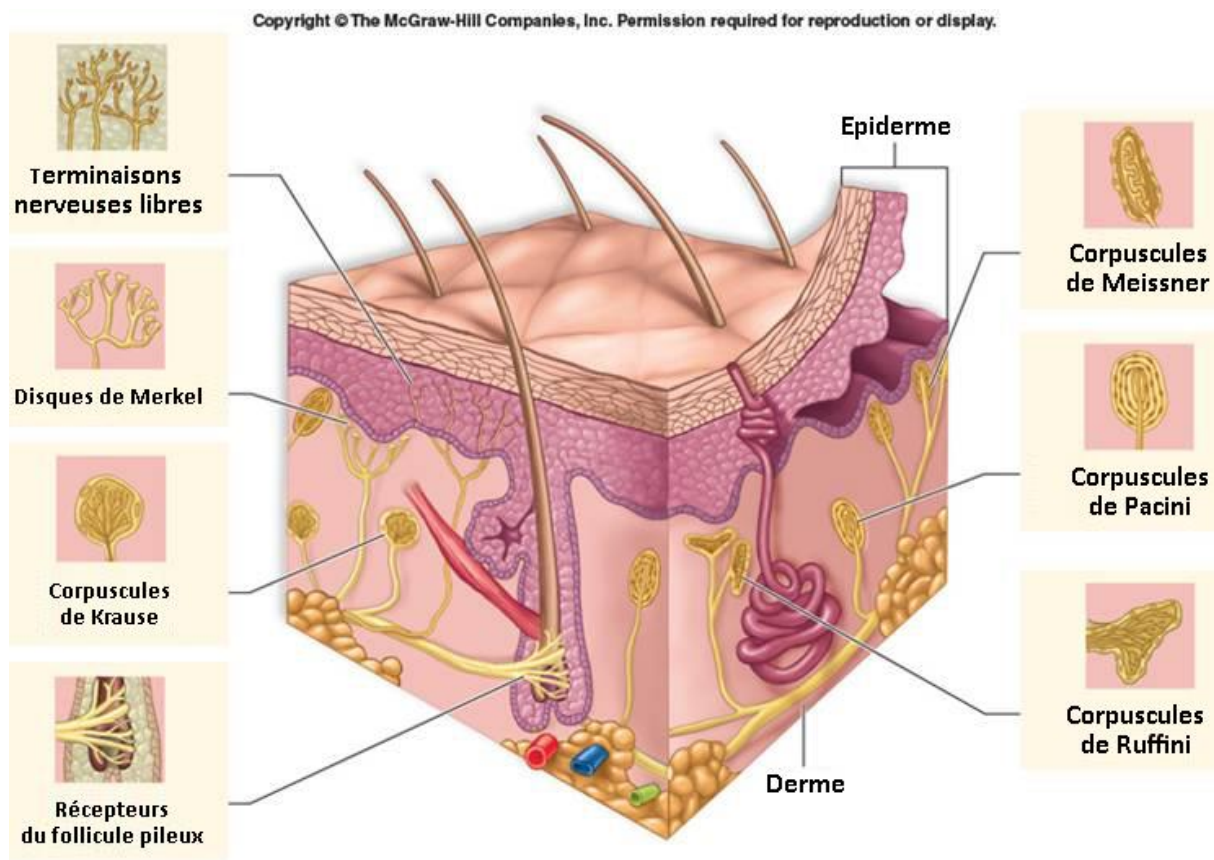


Figure 1 : Représentation schématique des mécanorécepteurs cutanés. Adapté de Mader 2007.

2. Les récepteurs proprioceptifs

La proprioception désigne la perception de la position des différentes parties de notre corps (angles formés par chacune de nos articulations) et de leurs mouvements (vitesse, direction, amplitude). Elle est liée à trois types de récepteurs proprioceptifs : les fuseaux neuromusculaires, les organes tendineux de Golgi et les récepteurs articulaires.

- **Le fuseau neuromusculaire** est constitué de fibres musculaires modifiées appelées fibres intrafusales, dont la partie polaire est contractile alors que la partie équatoriale ne l'est pas. Le fuseau reçoit une double innervation, sensitive et motrice. L'innervation sensitive est constituée de fibres afférentes de type Ia et II. Ces terminaisons sensibles sont activées par l'allongement de la fibre intrafusale sur laquelle elles reposent. Les fibres afférentes de type Ia possèdent des terminaisons qui s'enroulent autour de la partie équatoriale de la fibre intrafusale (terminaisons annulospirales) et renseignent sur la vitesse d'étirement du muscle. Les terminaisons secondaires quant à elles se terminent dans la partie péri-équatoriale et renseignent sur les variations de la longueur de la fibre musculaire. Ainsi, les fuseaux neuromusculaires sont des indicateurs de la vitesse et de la position du muscle (Hunt 1990).

- A la jonction entre les fibres musculaires et le tissu tendineux se trouvent **les organes tendineux du Golgi**. Ce sont des corpuscules fusiformes qui donnent naissance à des fibres afférentes de type Ib. Les organes tendineux de Golgi sont spécifiquement sensibles aux variations de tension du muscle et renseignent donc sur la force exercée par celui-ci (Jami 1992).

- Enfin, **les récepteurs articulaires** sont situés dans la capsule articulaire et sont activés par un angle articulaire précis. Lorsqu'un mouvement amène l'articulation autour de cet angle d'activation, on observe une augmentation de la décharge nerveuse proportionnelle à la vitesse de rotation de l'articulation (Strasman et al. 1990).

3. Innervation et moelle épinière

Chez le rat, les pattes postérieures sont innervées par les nerfs sciatique et saphène. La surface plantaire entière, le tiers dorso-latéral de la surface pileuse, la partie latérale et une partie postéro-médiane de la cheville sont innervés par le nerf sciatique. La surface pileuse qui s'étend de la partie dorsale des orteils 1 à 3 jusqu'à la partie dorso-médiane du pied, et la cheville, sont quant à elles innervées par le nerf saphène. Les fibres afférentes entrent dans la moelle par la racine dorsale, au niveau des segments lombaires L4 à L6 pour le nerf sciatique et L2 à L4 pour le nerf saphène (Wall et Cusick 1984) (Figure 2). Leur corps cellulaire est situé dans le ganglion spinal. A ce niveau, on distingue deux types de neurones. Des neurones de grande taille correspondent aux mécanorécepteurs à faible seuil d'activation, et des neurones de petite taille sont associés aux nocicepteurs et thermorécepteurs.

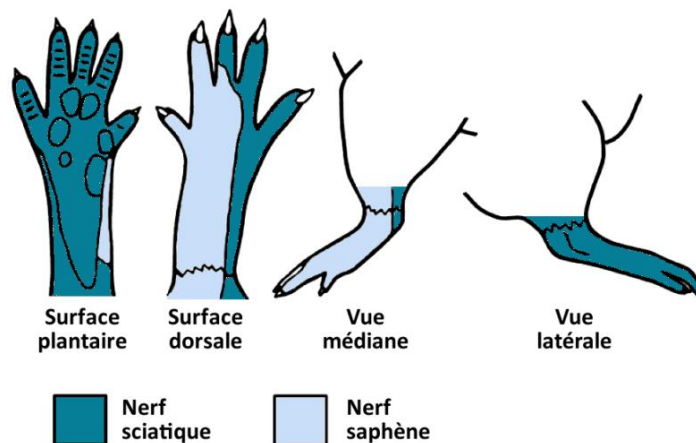


Figure 2 : Innervation de la patte postérieure de rat par les nerfs sciatique et saphène. Adapté de Wall et Cusick, 1984.

La substance grise de la moelle épinière est divisée en dix régions cytoarchitectoniques : les lames I à VI constituent la corne dorsale de la moelle épinière, la lame VII correspond à la zone intermédiaire, les lames VIII et IX constituent la corne ventrale ; la lame X quant à elle est située au centre de la moelle épinière et entoure le canal de l'épendyme (Figure 3). Chaque type de récepteur cutané se projette de manière spécifique dans la corne dorsale de la moelle épinière. En effet, les afférences des follicules

pileux se projettent dans les couches II à IV (Scheibel et Scheibel 1968), les mécanorécepteurs à adaptation rapide s'étendent dans les couches II à V alors que les couches II à VI reçoivent les projections des mécanorécepteurs à adaptation lente (Molander et al. 1984, 1989).

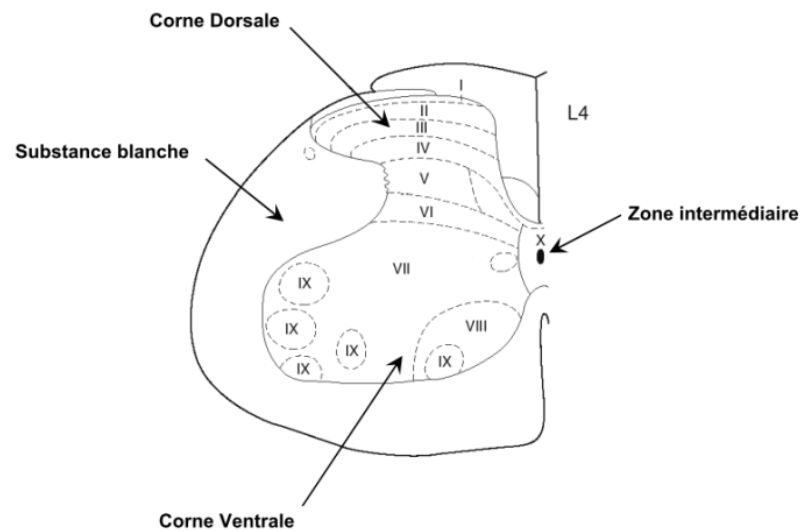


Figure 3 : Représentation schématique d'une coupe de moelle épinière au niveau de la racine L4. I-X : lames médullaires. Adapté de Paxinos et Watson, 1986.

4. Les voies de la somesthésie

a. La voie des colonnes dorsales

La voie des colonnes dorsales permet la propagation des informations sensorielles liées à la proprioception et à la sensibilité tactile fine des membres et du tronc vers l'encéphale. On distingue deux groupes de fibres ascendantes.

Le premier est nommé « voie directe des colonnes dorsales » (Figure 4A). Il correspond aux collatérales des fibres nerveuses provenant des mécanorécepteurs et dont les corps cellulaires sont situés dans le ganglion spinal. Les afférences sensorielles se projettent, via la moelle épinière, sur les noyaux gracile et cunéiforme du tronc cérébral. Les informations provenant des membres antérieurs et de la partie haute du tronc se terminent dans le noyau cunéiforme, alors que celles provenant des membres postérieurs et de la partie basse du tronc, se terminent dans le noyau gracile (Bolton et Tracey 1992). Ces noyaux présentent une organisation somatotopique.

Le second groupe correspond à la « voie post-synaptique des colonnes dorsales » (Figure 4B). Il est constitué d'afférences qui, au lieu de se projeter directement, effectuent un relais avec des neurones spinaux situés dans la corne dorsale de la moelle épinière (lame IV) ou dans la substance grise centrale. Par la suite, les fibres de la voie post-synaptique des colonnes dorsales et de la voie directe se superposent au niveau des noyaux gracile et cunéiforme. Cette voie post-synaptique représente 30 à 40 % des neurones qui se projettent vers les noyaux des colonnes dorsales (Giesler et al. 1984).

b. La voie spinothalamique

La voie spinothalamique (Figure 4C) transporte préférentiellement les informations thermoalgésiques et protopathiques (Pubols et Haring 1995). Par cette voie, les axones partant des mécanorécepteurs font synapse avec un autre neurone directement dans la moelle épinière. Ce neurone va ensuite se connecter directement au noyau ventro-postéro-latéral (VPL) du thalamus sans passer par les noyaux du tronc cérébral.

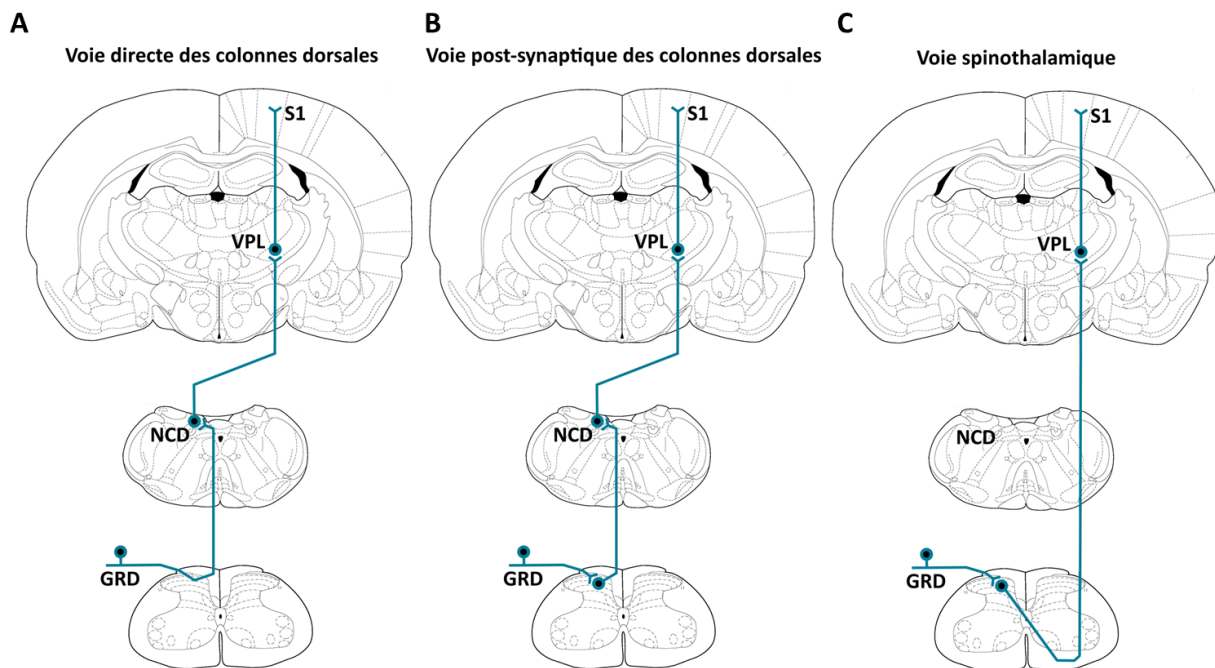


Figure 4 : Représentation schématique des voies somesthésiques chez le rat. A. Voie directe des colonnes dorsales. B. Voie post-synaptique des colonnes dorsales. C. Voie spinothalamique. GRD : Ganglion rachidien spinal ; NCD : noyaux des colonnes dorsales du tronc cérébral ; VPL : noyau ventro-postéro-latéral du thalamus ; S1 : cortex somesthésique primaire.

5. Le thalamus somesthésique

Après avoir établi un relais au niveau des noyaux du tronc cérébral, les afférences somesthésiques se projettent dans la partie ventrobasale du thalamus. Dans cette partie du thalamus, on distingue les noyaux ventropostérieurs latéral (VPL) et médian (VPM). Le VPL reçoit les informations tactiles en provenance du tronc et des membres alors que le VPM reçoit les informations provenant de la tête. Le groupe postérieur du thalamus, situé en arrière et dorsalement par rapport au complexe ventrobasal, reçoit lui aussi des afférences somesthésiques provenant des noyaux des colonnes dorsales (Lund et Webster 1967a) mais aussi de la moelle épinière (Lund et Webster 1967b). Chez le rat, tous les neurones du thalamus ventrobasal se projettent vers le cortex somesthésique primaire.

6. Le cortex somesthésique

a. Organisation anatomique

Chez le rat, on distingue deux aires différentes, l'aire somesthésique primaire et l'aire somesthésique secondaire, qui sont toutes deux situées au niveau du cortex pariétal. Les voies de la somesthésie se terminent par les projections des neurones thalamiques dans la couche IV du cortex somesthésique primaire.

Dans le cortex somesthésique primaire, une organisation en colonnes est observée. Les afférences du thalamus sont reçues par la couche IV (couche granulaire interne), qui transmet les informations aux couches plus superficielles (II : granulaire externe, et III: cellules pyramidales externes) (Armstrong-James et al. 1992). C'est au niveau de ces deux couches que se font les interactions entre le cortex somesthésique primaire et d'autres aires corticales comme le cortex somesthésique primaire controlatéral, le cortex somesthésique secondaire ou le cortex moteur (Bernardo et al. 1990 ; Colechio et Alloway 2009). De plus, les couches II et III transmettent les informations aux couches les plus profondes (V : cellules pyramidales internes, et VI : cellules fusiformes). Les neurones des couches V et VI se projettent majoritairement vers les différentes parties du thalamus (complexe ventrobasal, noyau réticulé). Toutefois, certains neurones de la couche V se projettent vers les noyaux

gracile et cunéiforme du tronc cérébral (Chmielowska et al. 1989; Feldmeyer et Sakmann 2000).

Chez le rat, le fonctionnement et le rôle du cortex somesthésique secondaire restent peu connus. Cette région reçoit des afférences thalamiques directes ; elle serait impliquée dans les traitements plus spécifiques des messages cutanés. Elle constituerait le dernier relais cérébral spécifiquement dédié au décodage des informations tactiles.

b. Organisation somatotopique

Il existe au niveau du cortex somesthésique une répartition topographique des afférences sensorielles provenant des différentes parties du corps, nommée somatotopie. Sur ces cartes somatotopiques, les zones de représentation des différentes parties du corps ne sont pas proportionnelles à leur taille réelle, mais à leur importance fonctionnelle. Ainsi, chez le rat, les vibrisses et les pattes antérieures sont très fortement représentées alors que le tronc l'est beaucoup moins. Au sein de la zone de représentation de la patte postérieure, les orteils sont représentés sur la partie la plus antérieure, puis les coussinets, la voûte plantaire et enfin la jambe sur la partie la plus postérieure (Wall et Cusick 1984).

La zone de représentation du pied est située en position médiane (coordonnées latérales : 2-4 mm par rapport au bregma). Dans le sens antéro-postérieur, elle se situe entre 1 et 4 mm en arrière du Bregma. Elle est entourée de la représentation de la queue (plus médiane et caudale), et, postérieurement, par la représentation de la jambe. Enfin, antérieurement et latéralement, cette zone est limitrophe à la représentation de la patte antérieure (Figure 5) (Fabri et Burton 1991).

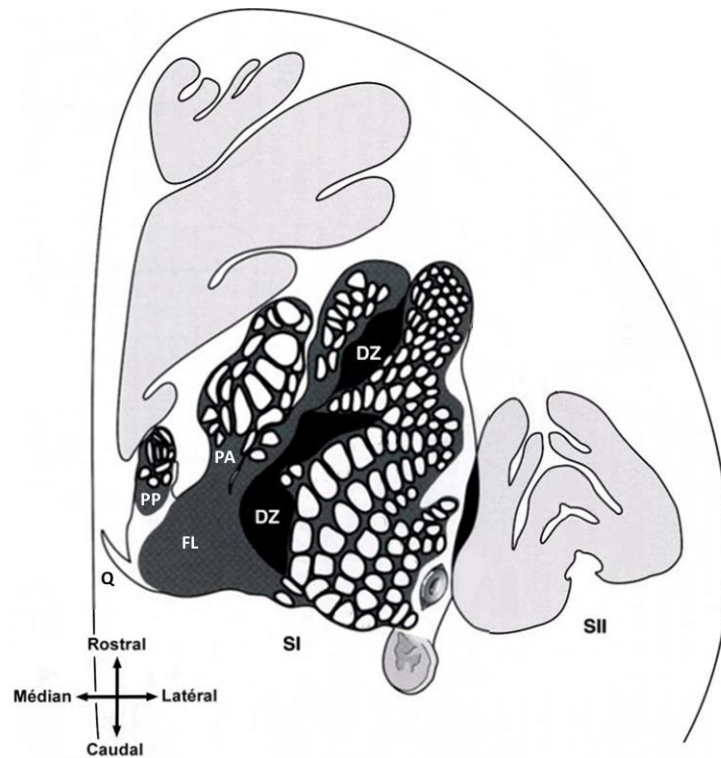


Figure 5 : Organisation somatotopique du cortex somesthésique du rat. SI : cortex somesthésique primaire ; SII : cortex somesthésique secondaire ; DZ : zone dysgranulaire centrale ; PP : patte postérieure ; PA : patte antérieure ; FL : Flanc ; Q : queue. Adapté de Fabri et Burton, 1991.

B. Le système moteur

La motricité regroupe l'ensemble des fonctions nerveuses et musculaires permettant la réalisation d'un mouvement, qu'il soit volontaire (motricité volontaire), automatique (locomotion), ou réflexe. Elle consiste donc en la mise en place d'une commande motrice d'origine nerveuse et en la transduction de cette information motrice jusqu'aux différents effecteurs musculaires qui permettent la genèse d'un mouvement. Le système moteur comporte plusieurs niveaux de contrôle du mouvement, organisés de façon hiérarchique. Les fibres musculaires organisées en unités motrices reçoivent, via le nerf moteur, une stimulation provenant des structures centrales. La moelle épinière présente une activité essentiellement réflexe ; elle est sous régulation du tronc cérébral. Le cortex moteur agit sur les deux précédents pour organiser le mouvement volontaire.

1. Le muscle et l'unité motrice

L'organe effecteur de la motricité est le muscle strié, organe spécialisé dans le développement d'une force sous le contrôle du système nerveux. Fonctionnellement, il est responsable des mouvements du corps (activité motrice cinétique) ou du maintien d'une posture (activité motrice posturale). Le rôle d'un muscle peut être directement corrélé aux types de fibres qui le composent. On observe trois principaux types de fibres musculaires squelettiques (Tableau 1).

Type de Fibre	I	IIA	IIB
Type d'Unité Motrice	S	FR	FF
CARACTERISTIQUES METABOLIQUES			
Concentration de myoglobine	Nombreuses	Intermédiaire	Pauvre
Voie de synthèse de l'ATP	Oxydative	Mixte	Glycolytique
Réserves de glycogène	Elevées	Intermédiaires	Pauvres
Activité ATPasique	Lente	Intermédiaire	Rapide
CARACTERISTIQUES MECANIQUES			
Force	Faible	Intermédiaire	Forte
Fatigabilité	Faible	Intermédiaire	Forte
Vitesse de contraction	Lente	Rapide	Rapide
CARACTERISTIQUES STRUCTURALES			
Mitochondries	Nombreuses	Intermédiaire	Peu nombreuses
Irrigation capillaire	Riche	Intermédiaire	Pauvre
Diamètre	Petit	Moyen	Gros

Tableau 1 : Propriétés des différents types de fibres musculaires

Les muscles impliqués dans l'activité motrice cinétique sont composés majoritairement de fibres de type IIB. Ces fibres sont innervées par de gros motoneurones. L'ensemble des fibres musculaires innervées par un même motoneurone est appelé unité motrice. Ainsi, l'unité motrice est la plus petite unité contractile que le système nerveux puisse mettre en jeu. Les unités motrices qui rassemblent des fibres musculaires de type IIB sont classiquement appelées FF (« *fast fatigable* »). Selon le principe d'Henneman (Henneman 1957), les petits motoneurones sont plus excitables que les gros. Ainsi, ces unités motrices possèdent un seuil d'activation élevé. Par ailleurs, la taille d'une unité motrice varie en fonction de la précision du mouvement induit : plus le muscle sera impliqué

dans des mouvements fins, plus l'unité motrice sera petite. Ainsi, les unités motrices FF sont généralement de petite taille, c'est-à-dire qu'elles rassemblent un petit nombre de fibres musculaires.

A l'opposé, les muscles impliqués dans l'activité motrice posturale sont composés majoritairement de fibres de type I. Ces muscles ne développent qu'une faible force mais s'avèrent résistants à la fatigue. Ces fibres musculaires sont innervées par de petits motoneurones ayant de faibles seuils d'activation. Les unités motrices composant ces fibres sont appelées S (« *Slow* »). Elles sont généralement de grande taille et regroupent donc un grand nombre de fibres musculaires.

Enfin, les muscles peuvent être composés d'un troisième type de fibre : les fibres de type IIA. Elles sont innervées par des motoneurones de taille intermédiaire, ayant des seuils d'activation plus faibles que les motoneurones innervant les unités motrices FF mais plus élevés que ceux des unités motrices S. Les unités motrices correspondantes sont dites FR (« *fast resistant* »). Elles sont sollicitées pour les mouvements peu amples et exécutés à vitesse modérée.

2. La moelle épinière

Les motoneurones qui sont impliqués dans les unités motrices sont les motoneurones α . Ils sont dits "squelettomoteurs" car ils innervent de façon spécifique les fibres extrafusales des muscles striés squelettiques. Les motoneurones γ sont dit « fusimoteurs » car ils se projettent sur les fibres intrafusales de ces muscles. Ils interviennent dans le contrôle de la sensibilité des fuseaux neuromusculaires. Ils sont deux fois moins nombreux que les motoneurones α et le diamètre de leur axone est plus petit. Les motoneurones β sont dit « squeletto-fusimoteur » car ils se projettent à la fois sur les fibres extrafusales et intrafusales. Leur axone myélinisé a une taille similaire aux axones des motoneurones α ce qui rend leur identification difficile. Pour cette raison, leur nombre et leur fonction sont mal connus.

Les motoneurones α des membres et du tronc sont localisés dans la corne ventrale de la moelle épinière au niveau de la lame motrice IX (Figure 3). Les muscles des membres postérieurs sont principalement innervés par le nerf tibial et le nerf sciatique, issus des

niveaux lombaires L4, L5, et L6. Leurs axones quittent la moelle épinière par la corne ventrale (Greene 1963).

3. Contrôle de l'activité des motoneurones

Les motoneurones α constituent la « voie finale commune ». En effet, ils sont l'ultime étape de la voie qui conduit à l'exécution d'un mouvement (qu'il soit réflexe, automatique ou volontaire). L'activité du motoneurone, et donc du muscle qu'il innerve, est directement dépendante d'afférences supraspinales (originaires du cortex ou du tronc cérébral), spinales ou périphériques (fuseau neuromusculaire, organe tendineux de Golgi, afférences cutanées...) (Figure 6).

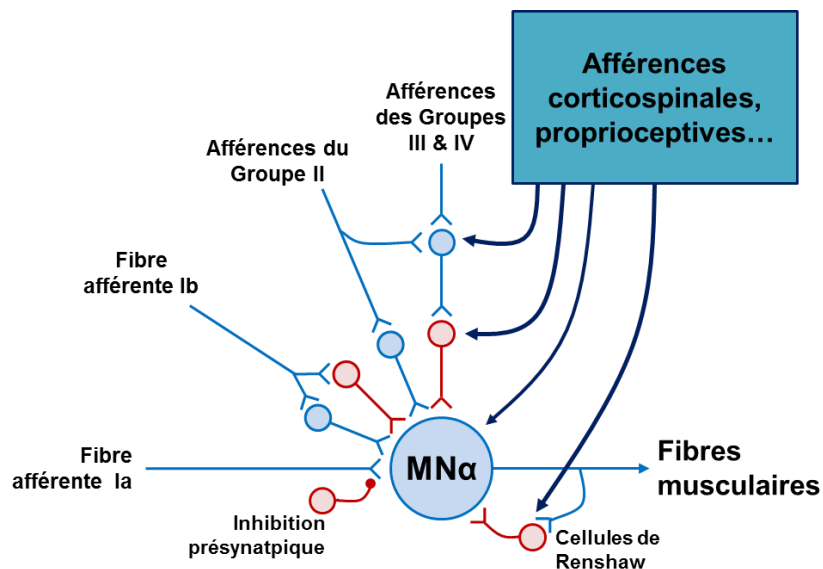


Figure 6 : Représentation schématique de la « voie finale commune ». La commande motrice qui est véhiculée par le motoneurones α est modulée par une somme d'informations : (1) afférences sensorielles proprioceptives (fibres Ia, Ib et II), nociceptives ou métaboliques (fibres III finement myélinisées ou IV amyéliniques) ; (2) mécanismes intraspinaux de régulation (inhibition récurrente par les cellules de Renshaw, qui contribuent en outre à ajuster la commande centrale lors d'un mouvement volontaire ; inhibition présynaptique, qui régule le flux d'information afférentes d'origine périphérique) ; (3) afférences d'origine supraspinale (notamment corticospinale). Les cellules bleues sont excitatrices, les rouges sont inhibitrices. Adapté de Gandevia (2001).

a. Les voies motrices ayant pour origine le tronc cérébral

La voie rubrospinale (Figure 7A). Les neurones du noyau rouge reçoivent des afférences corticales et cérébelleuses, et se projettent en retour au niveau de la moelle épinière, où ils se connectent aux motoneurones contrôlant les muscles des membres. Chez le rat, la voie rubrospinale joue un rôle important dans l'initiation et l'exécution des mouvements volontaires, notamment des membres antérieurs (Whishaw et al. 1998; Küchler et al. 2002). Elle est aussi impliquée dans la coordination entre les membres antérieurs et postérieurs lors de la locomotion (Muir et Whishaw 2000).

La voie réticulospinale (Figure 7B). Cette voie prend son origine dans la formation réticulée et se projette vers la moelle épinière par les tractus réticulospinaux médian (originaire du pont) et latéral (originaire du bulbe). Les neurones de la formation réticulée reçoivent de nombreuses connexions d'autres structures comme l'hypothalamus, le cervelet, le thalamus et la moelle épinière. Cette voie intervient principalement dans le maintien de la posture par une action sur les muscles antigravitaires (Peterson et al. 1975 ; Robbins et al. 1992).

La voie vestibulospinale (Figure 7C). Elle a pour origine les noyaux vestibulaires, situés au niveau du plancher du quatrième ventricule. On distingue les noyaux vestibulaires supérieur, latéral, médian et inférieur. Les noyaux supérieur et latéral se trouvent dans la partie caudale du pont alors que les noyaux médian et inférieur se trouvent dans la partie rostrale. Ces noyaux sont à l'interface du système vestibulaire et du reste du système moteur. Les axones des neurones de ces noyaux constituent deux faisceaux de fibres nerveuses : le tractus vestibulospinal médian et le tractus vestibulospinal latéral. Cette voie intervient dans le maintien de l'équilibre postural.

La voie colliculospinale (Figure 7D). Les axones partant du colliculus supérieur se projettent vers la moelle épinière où ils influent sur le contrôle des muscles du cou. Les projections de cette voie motrice sont particulièrement importantes dans la production de mouvements réflexes de la tête en réponse à des stimuli visuels.

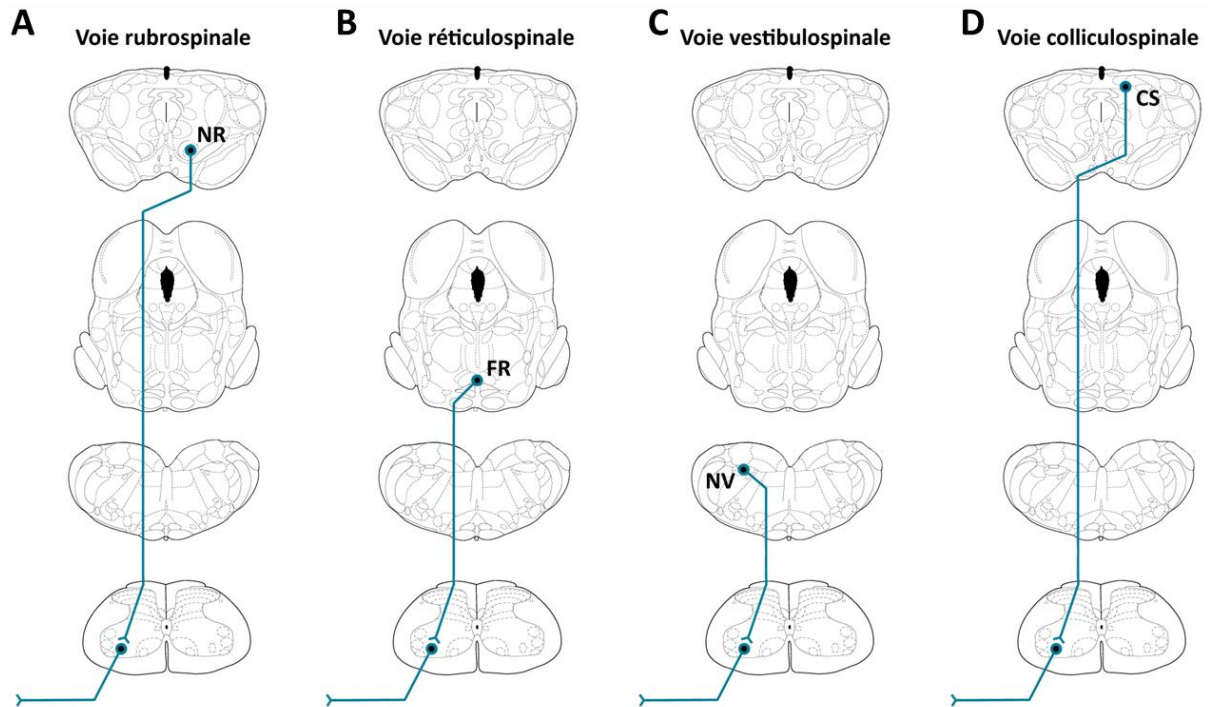


Figure 7 : Représentation des voies motrices issues du tronc cérébral chez le rat. NR : noyau rouge ; FR : formation réticulée ; NV : noyaux vestibulaires ; CS : Colliculus supérieur.

b. Les voies motrices ayant pour origine le cortex

La voie corticospinale directe ou voie pyramidale est impliquée dans la réalisation des mouvements volontaires fins (Lawrence et Hopkins 1976 ; Whishaw et al. 1998). Les axones des neurones de la couche V du cortex moteur se projettent jusqu'à la moelle épinière en passant par le faisceau pyramidal du tronc cérébral (Brown 1971 ; Joosten et al. 1992 ; Brösamle et Schwab 1997). Ainsi, chez le rat, les axones des neurones provenant de la représentation de la patte postérieure se projettent jusqu'à la moelle épinière lombaire (L4 à L6) et établissent des connexions avec les motoneurones commandant les muscles des pattes postérieures (Li et al. 1990 ; Nieuwenhuys et al. 2008) (Figure 8).

La voie corticospinale indirecte. Cette voie fait partie des voies extrapyramidales (Figure 7). Certaines fibres nerveuses motrices corticales se projettent sur la substance réticulée et les noyaux vestibulaires du tronc cérébral. A partir de ces noyaux, l'information est transmise directement à la moelle via les faisceaux réticulospinal et vestibulospinal, ou au cervelet via les faisceaux réticulocérébelleux et vestibulocérébelleux. Cette voie participe principalement au contrôle de la musculature axiale lors des ajustements posturaux.

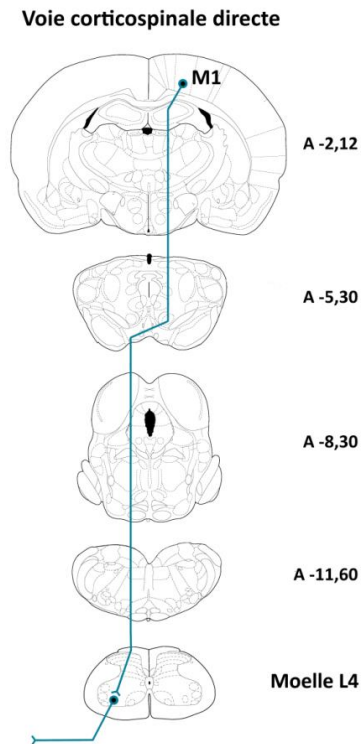


Figure 8 : Représentation schématique de la voie motrice corticospinale directe. M1 : Cortex moteur primaire.

4. Le cortex moteur

a. Organisation anatomique

Chez les mammifères, le cortex moteur primaire correspond aux territoires corticaux sur lesquels une stimulation de faible intensité permet de générer un mouvement. Il interagit avec de nombreuses autres structures impliquées dans le contrôle moteur, comme le cervelet ou les noyaux gris centraux, ou dans l'intégration des signaux sensoriels, comme le cortex somesthésique. On observe au sein du cortex moteur une organisation en colonnes. Les couches corticales II et III reçoivent les afférences des autres aires corticales ou du thalamus (Jones 1975). Les informations se propagent ensuite vers la couche corticale V qui conclut l'initiation du mouvement volontaire (Weiler et al. 2008). De plus, afin de coordonner l'activité neuronale lors de la production de mouvements, il existe d'autres échanges entre les couches V des différentes colonnes corticales correspondant aux autres représentations fonctionnelles des membres.

b. Organisation fonctionnelle

Comme au niveau du cortex somesthésique, il existe au niveau du cortex moteur une représentation somatotopique des différentes parties du corps (Neafsey et al. 1986) (Figure 9). La surface corticale dédiée à chaque partie du corps est liée à la précision des mouvements réalisés par le membre. Par exemple, chez l'homme, les zones les plus représentées sont le visage et les mains, alors que chez le rat, ce sont les vibrisses et les pattes antérieures. Chez le rat, la zone de représentation des pattes postérieures est située en position médiane et s'étend latéralement de 2 à 4 mm et antérieurement de 0 à 2 mm en arrière du Bregma. Elle est entourée, antérieurement et latéralement, par la zone de représentation de la patte antérieure, médialement par la zone de représentation de la queue, et postérieurement par la représentation du reste de la patte postérieure. Toutefois, au sein de chaque représentation de segment du corps, les surfaces corticales représentant les différentes parties du corps se chevauchent. Par exemple, au sein de la représentation de la patte antérieure du rat, une superposition de la représentation des mouvements du poignet et des doigts est observée (Kleim et al. 1998). On notera que, chez le rat, le cortex somesthésique lié aux membres postérieurs se superpose au cortex moteur (Weiss et Keller 1994).

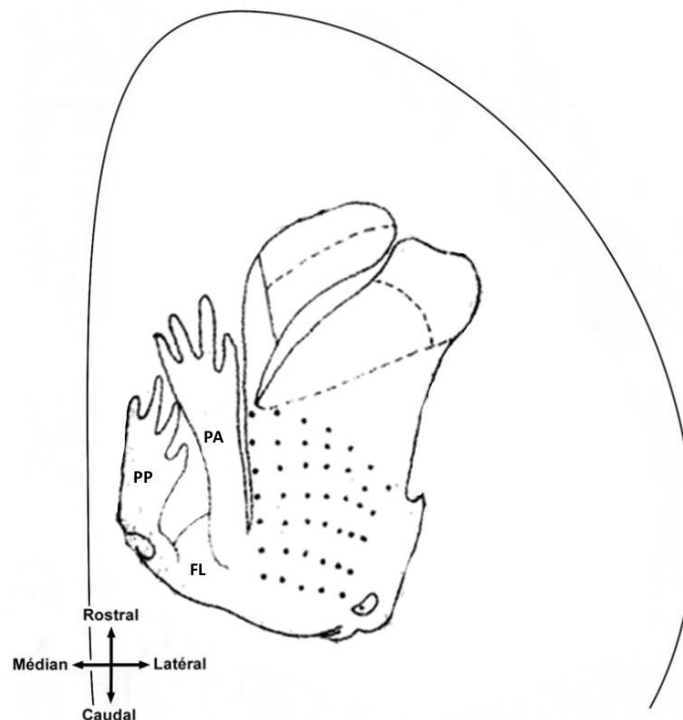


Figure 9 : Organisation somatotopique du cortex moteur du rat. PP : patte postérieure ; PA : patte antérieure ; FL : Flanc. Adapté de Neafsey et al., 1986

II. *Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1)*

A. Historique

En 1957, Salmon et Daughaday démontrèrent l'existence d'un facteur sanguin, jouant un rôle dans la sulfatation du cartilage et dans la croissance osseuse, qu'ils nommèrent facteur de sulfatation. Dans le cadre de leurs travaux sur l'hormone de croissance, ils formulèrent l'hypothèse que ce facteur serait un médiateur périphérique des effets de l'hormone de croissance. En 1963, Froech et collaborateurs mirent en évidence des molécules sanguines qui favorisent la croissance cellulaire. Ils remarquèrent que ces molécules ont des effets similaires à ceux de l'insuline, bien que ceux-ci ne soient pas inhibés par l'ajout d'anticorps anti-insuline. Ils nommèrent donc ces molécules NSILA-1 et 2 (*non suppressible insuline-like activity*) (Dulak et Temin 1973). Quelques années plus tard, après analyse des chaînes polypeptidiques, il s'avéra que le NSILA-1 et le facteur de sulfatation correspondaient à la même molécule. Elle reçut alors le nom de somatomédine (Daughaday et al. 1972). En 1976, il apparut que les NSILA-1 et 2 étaient deux protéines dont la structure était très semblable à celle de l'insuline (Rinderknecht et Humbel 1976), ce qui conduisit finalement en 1978, à la dénomination actuelle *d'insulin-like growth factor 1 et 2* (Rinderknecht et Humbel 1978a, b).

Les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse se sont focalisés sur l'action de l'IGF-1. Nous ne développerons donc pas ci-dessous la structure et le rôle de l'IGF-2.

B. Régulation de l'IGF-1

1. Structure de l'IGF-1

L'IGF-1 est une chaîne polypeptidique de 70 acides aminés. Son poids moléculaire est de 7649 Da (Rinderknecht et Humbel 1978b). Elle contient quatre domaines (Figure 10A) :

- un domaine A de 21 acides aminés ;
- un domaine B de 29 acides aminés, correspondant à l'extrémité amino-terminale, impliqué dans la fixation de la protéine à son récepteur ;

- un domaine C de 12 acides aminés, comprenant une tyrosine induisant l'autophosphorylation de son récepteur ;
- un domaine D de 8 acides aminés correspondant à l'extrémité carboxy-terminale.

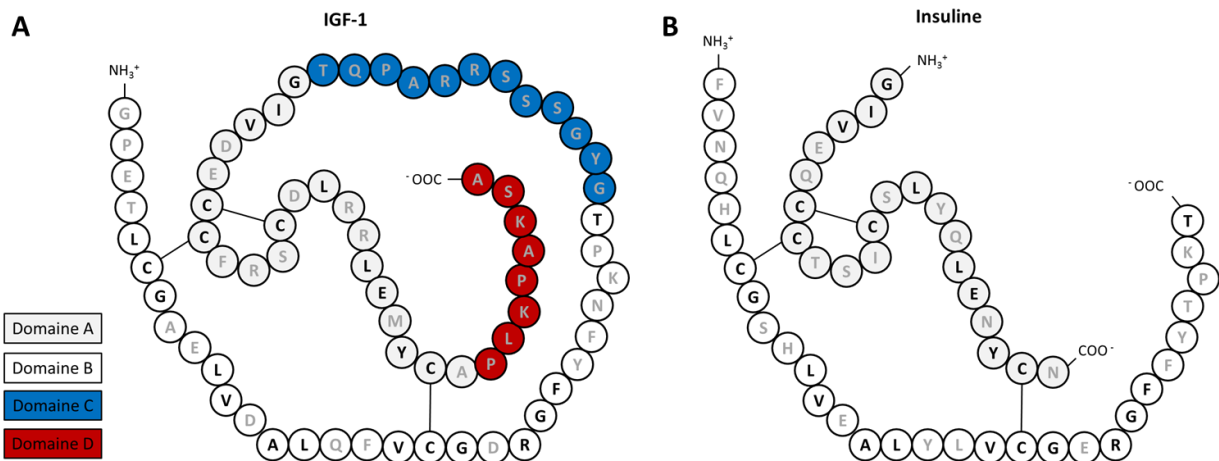


Figure 10 : Séquence d'acides aminés de l'IGF-1 (A) et de l'insuline (B). A : Les acides aminés en gris, blanc, bleu et rouge correspondent respectivement aux domaines A, B, C, D de l'IGF-1. B : les lettres noires correspondent aux acides aminés communs entre l'IGF-1 et l'insuline. Les lettres grises correspondent aux acides aminés différents.

Sa structure est très semblable à celle du précurseur de l'insuline (Figure 10B). En effet, la différence majeure entre ces peptides provient de l'excision du domaine C lors de la maturation de l'insuline. De plus, cette protéine est très conservée au sein du règne animal. Il apparaît que 81 % de la protéine mature est identique chez les mammifères, les oiseaux et les amphibiens et il n'y a que trois acides aminés différents entre l'IGF-1 humain et l'IGF-1 de rat (pour revue Rotwein 1991).

2. Sécrétion d'IGF-1

La sécrétion d'IGF-1 est nécessaire au développement normal de l'organisme. Chez le fœtus, des ARN (acide ribonucléique) messagers pour l'IGF-1 sont rencontrés dans tous les tissus embryonnaires (Watson et al. 1994), et une production locale d'IGF-1 est observée dans l'utérus et le placenta (Stevenson et al. 1994 ; Reynolds et al. 1997). Après la naissance, le taux d'expression de la protéine augmente fortement, atteint un pic d'expression à 6 mois

chez l'humain (Rotwein et al. 1988 ; Bondy et al. 1992), puis diminue progressivement tout au long de la vie de l'organisme. Cette courbe d'expression de l'IGF-1 varie d'une espèce à l'autre (2 semaines chez le rat) ; toutefois, de manière générale, les taux d'expression de l'IGF-1 sont plus importants lors du développement que chez l'adulte (Bondy et Lee 1993 ; Juul et al. 1995). Chez l'adulte, l'IGF-1 est produite essentiellement au niveau du foie. Cependant, il a été prouvé que de nombreux tissus périphériques (muscles, reins, poumons, organes sexuels...) comme centraux (neurones corticaux) synthétisent également de l'IGF-1 (Russo et al. 2005).

Au niveau central, l'IGF-1 est exprimé par les neurones et les cellules gliales de nombreuses structures cérébrales. En effet, par des techniques d'amplification en chaîne par polymérase (Bondy 1991), comme par technique d'hybridation *in situ* (Werther et al. 1990), des ARN messagers pour l'IGF-1 ont été retrouvés dans presque toutes les structures cérébrales avec, toutefois, des niveaux d'expression variables. Ainsi, l'IGF-1 est exprimé majoritairement dans le bulbe olfactif, l'hippocampe et le cervelet. Dans chaque structure, l'IGF-1 est exprimé principalement par les neurones ayant une arborisation dendritique dense (Bondy et Lee 1993) et par les astrocytes (Chernausek 1993).

La sécrétion d'IGF-1 par le foie est contrôlée par l'hormone de croissance (GH, *growth hormone*) produite par l'hypophyse. La GH est elle-même sous l'influence d'hormones hypothalamiques, la GHRH (*growth hormone releasing hormone*) et la somatostatine.

La GHRH est sécrétée de façon pulsatile par l'hypothalamus. En se fixant sur ses récepteurs hypophysaires, la GHRH induit la production et l'exocytose de GH (Figure 11). Une fois libérée dans la circulation sanguine, la GH agit en périphérie en se fixant à son récepteur et induit l'activation de nombreuses voies de signalisation, comprenant les voies JAK-STAT (*janus kinase - signal transducers and activators of transcription*), MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), PKC (*protein kinase C*) et IRS (*insulin receptor substrate*) (Roupas et Herington 1994). Au final, ces différentes voies de signalisation induisent une augmentation de l'expression du gène codant pour l'IGF-1. En conséquence, l'IGF-1 est synthétisé et libéré dans la circulation sanguine (Xu et Sonntag 1996).

L'IGF-1 libéré dans le sang exerce un effet rétroactif sur l'hypophyse et l'hypothalamus, réduisant ainsi la sécrétion de GH. Cet effet est renforcé par le fait que la GH libérée dans le sang induit la production de somatostatine par l'hypothalamus, qui inhibe en retour la production de GH (Sonntag et al. 2005).

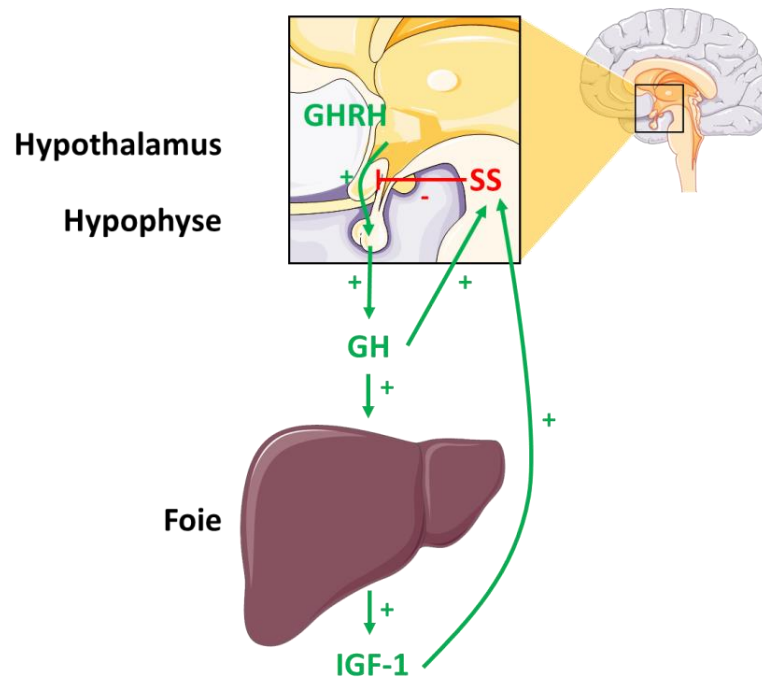


Figure 11 : Représentation de l'axe GH/IGF-1. GHRH: *growth hormone releasing hormone*. GH : *growth hormone*, SS : *somatostatine*, IGF-1 : *insulin-like growth factor 1*.

3. *Insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs)*

Les IGFBPs appartiennent à une famille de 6 protéines de liaison spécifiques (IGFBP-1 à IGFBP-6) capables de se lier avec une grande affinité à l'IGF-1. Il existe également des protéines nommées IGFBP-7, IGFBP-8, IGFBP-9 et IGFBP-10, aussi appelées respectivement MAC25, *connective tissue growth factor*, NOV et CYR61. Toutefois, ces protéines sont structurellement assez différentes des autres IGFBPs et ne se lient pas aux protéines de la famille des IGFs. De ce fait, ces protéines ont été classées dans une sous-famille d'IGFBPs nommée IGFBP related proteins, et la communauté scientifique s'accorde maintenant pour ne reconnaître comme IGFBPs que les seules IGFBP-1 à 6 (Baxter 2014).

Les IGFBPs matures, comprenant entre 213 et 289 acides aminés, contiennent trois domaines : les deux domaines amino- et carboxy-terminaux sont très semblables d'une IGFBP à l'autre ; le dernier, central, diffère et induit la spécificité (Figure 12A). Enfin, ce domaine central peut être soumis à des modifications post-traductionnelles (O/N-glycosylations ; phosphorylations) (Firth et Baxter 2002).

Présentes de façon ubiquitaire, les IGFBPs coordonnent et régulent l'activité biologique de l'IGF-1 (Figure 12B). En effet, l'affinité de ces protéines pour l'IGF-1 est plus importante que celle des récepteurs. Ainsi, l'IGF-1 se lie préférentiellement aux IGFBPs, et leur présence rend donc l'IGF-1 moins disponible pour son récepteur. Ces protéines de liaison modulent ainsi négativement l'action de l'IGF-1. A l'inverse, il existe des protéases spécifiques dont l'action est de cliver les IGFBPs. L'expression de ces protéases par les cellules cibles rend l'IGF-1 disponible, à proximité de son récepteur, et permettent sa fixation. En outre, la liaison de l'IGF-1 aux IGFBPs permet d'augmenter sa demi-vie dans le sang. En effet, l'IGF-1 libre a une demi-vie inférieure à 10 min dans le sang, alors que lorsqu'il est couplé à ses protéines de liaison, sa demi-vie dépasse les 12 h (Figure 12C).

IGFBP-1 : L'IGFBP-1 est majoritairement exprimée au niveau du foie et est fortement impliquée dans les effets métaboliques de l'IGF-1. Plusieurs études ont montré des effets potentialisateurs comme inhibiteurs de l'IGFBP-1 (Jones et Clemmons 1995). Cette modulation est liée à l'état de phosphorylation de la protéine. La forme phosphorylée a une plus forte affinité pour l'IGF-1 que le récepteur, limitant ainsi sa biodisponibilité. La déphosphorylation de l'IGFBP-1 diminue fortement l'affinité de celle-ci pour l'IGF-1 permettant donc, après libération, la fixation de l'IGF-1 à son récepteur (Jones et al. 1993). Toutefois, la phosphorylation de l'IGFBP-1 n'a pas d'effet sur son affinité pour l'IGF-1 chez le rat, indiquant que ces mécanismes de régulation décrits chez l'homme ne concerneraient pas nécessairement toutes les espèces (Peterkofsky et al. 1998). Enfin, au niveau cérébral, l'IGFBP-1 est peu présente et semble ne pas avoir de rôle prépondérant. En effet, une délétion de son gène n'a pas d'effet sur le fonctionnement cérébral. Toutefois on notera qu'une surexpression du gène dans le cerveau induit une atrophie cérébrale dont le phénotype est nommé « *smallbrain* » (D'Ercole et al. 1994). Un tel phénotype est également rencontré chez des animaux Knock-Out IGF-1 (Beck et al. 1995). Ces observations suggèrent bien l'existence de mécanismes d'inhibition par séquestration de l'IGF-1.

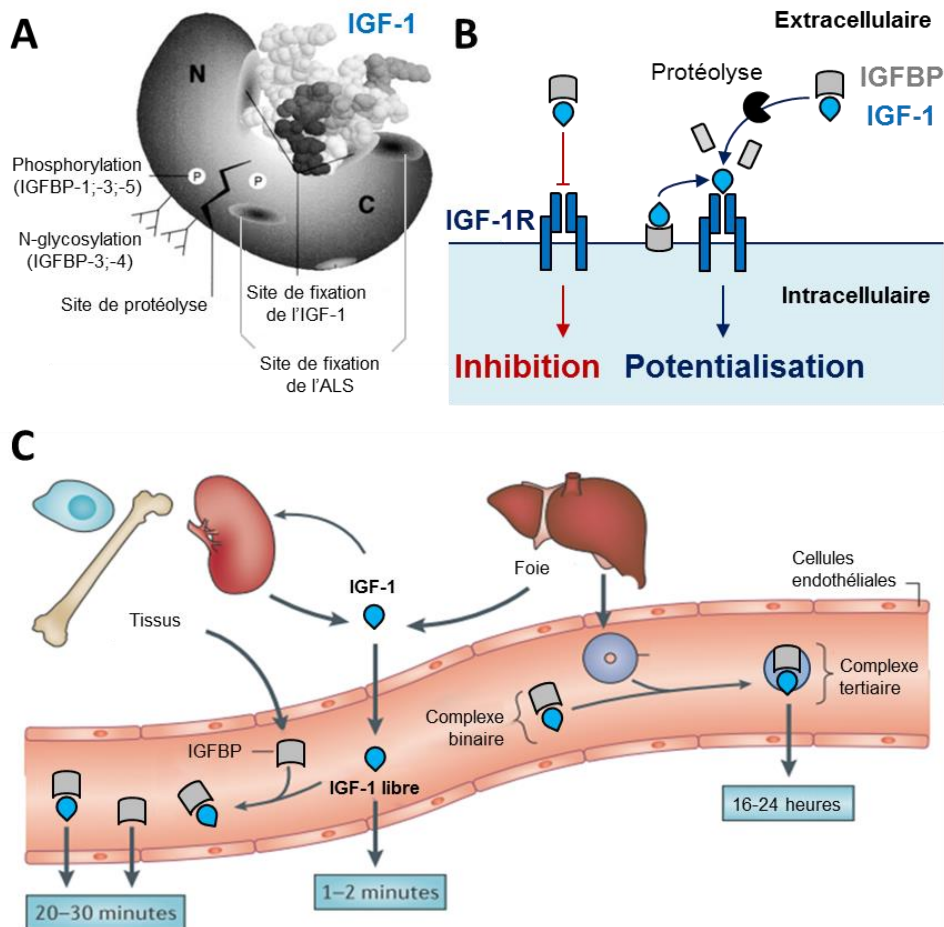


Figure 12 : Structure et fonction des IGF-BPs. A : Structure générale des IGF-BPs montrant leur interaction avec l'IGF-1. Les différents sites de modifications post-traductionnelles sont indiqués. Adapté de Firth et Baxter (2002). B : Voies d'action des IGF-BPs sur l'IGF-1 et sa fixation sur son récepteur. Les IGF-BPs modulent positivement ou négativement la fixation de l'IGF-1 sur son récepteur. C : Transport de l'IGF-1 dans la circulation sanguine. L'IGF-1 peut être libre ou lié à des IGF-BPs, ou encore sous forme de complexe ternaire (ALS+IGFBP+IGF-1). Adapté de Baxter (2014).

IGFBP-2 : Après l'IGFBP-3, l'IGFBP-2 est la forme la plus abondante d'IGFBPs dans la circulation sanguine. Cette protéine de liaison joue un rôle prépondérant dans le développement cérébral. Elle est exprimée de façon précoce dans l'épithélium du plexus choroïde et l'infundibulum, et ensuite dans l'ensemble du cerveau, et particulièrement dans le bulbe olfactif, le cervelet et l'hippocampe (Wood et al. 1990). Dans les tissus cérébraux, l'IGFBP-2 est fixée à des protéoglycanes de surface trouvés au niveau des cellules neuronales (Russo et al. 1997). Comme les autres IGFBPs, l'IGFBP-2 diminue la biodisponibilité de l'IGF-1 en la séquestrant (Höflich et al. 1998). Toutefois, les effets de l'IGF-1 sur la neurogenèse des cellules souches sont potentialisés par l'IGFBP-2 (Brooker et al. 2000). En effet, l'IGFBP-2 au

niveau cérébral permet de réguler l'apport d'IGF-1 à une cellule cérébrale : le complexe IGFBP-2 / IGF-1 est stocké dans l'espace péricellulaire ; quand la cellule a besoin d'IGF-1, elle libère des protéases spécifiques qui clivent l'IGFBP-2 et rendent donc disponible l'IGF-1 rapidement.

IGFBP- 3 : L'IGFBP-3 est la protéine de liaison la plus abondamment retrouvée dans la circulation sanguine. En effet, 80 % de l'IGF-1 plasmatique est retrouvé sous forme de complexe avec l'IGFBP-3 et l'ALS (*acid-labile subunit*) (Lewitt et al. 1994) (Figure 12C). La formation de ces complexes augmente considérablement la demi-vie de l'IGF-1 dans le sang de quelques minutes pour l'IGF-1 libre, à 30 minutes quand il est lié à l'IGFBP-3 et jusqu'à 16 heures sous forme de complexe ternaire avec l'ALS (Rajaram et al. 1997). L'expression de l'IGFBP-3 et de l'ALS est régulée, comme pour l'IGF-1, par l'hormone de croissance (Kanety et al. 1993). L'IGFBP-3 est sécrétée naturellement dans le système nerveux central à de faibles quantités (Ocrant et al. 1990). Toutefois, la fonction de l'IGFBP-3 au niveau cérébral reste encore méconnue.

IGFBP-4 et IGFBP-5 : Ces deux IGFBPs sont fortement exprimées au niveau du système nerveux, notamment dans les astrocytes et les cellules épithéliales (Chernausk 1993). La synthèse de ces protéines de liaison est directement sous l'influence de l'IGF-1. En effet, l'IGF-1 diminue les taux d'IGFBP-4 en activant des protéases spécifiques et augmente les taux d'IGFBP-5 (Duan et Clemmons 1998). Les effets de ces IGFBPs sur l'IGF-1 sont opposés : l'IGFBP-4 limite l'interaction entre l'IGF-1 et son récepteur, alors que l'IGFBP-5 favorise cette fixation. L'action de l'IGF-1 est donc régulée par l'équilibre entre les taux d'IGFBP-4 et d'IGFBP-5 (Firth et Baxter 2002).

IGFBP-6 : Le rôle de l'IGFBP-6 est assez méconnu. Toutefois, il s'avère que l'IGFBP-6 se lie préférentiellement à l'IGF-2 et semble inhiber son action. Bien que son rôle soit majoritairement lié à l'IGF-2, certaines études suggèrent que cette protéine de liaison aurait aussi des actions indépendantes de l'IGF-2 (Bach 2005).

4. Les neuropeptides dérivés de l'IGF-1

En 1986, Sara et ses collaborateurs ont montré l'existence d'une forme d'IGF-1 retrouvée exclusivement au niveau cérébral (Sara et al. 1986), dont les trois premiers acides aminés de l'extrémité amino-terminale (GPE ; Glycine-Proline-Glutamate) sont tronqués, sous l'action d'une protéase acide, présente dans le sang comme dans l'espace cérébral (Yamamoto et Murphy 1995). Les effets de la forme tronquée sont similaires à ceux de la forme native. En effet, l'IGF-1 tronqué agit en se liant au récepteur à l'IGF-1, en induisant leur phosphorylation et l'activation des voies de signalisation associées (Sara et al. 1993). Toutefois, la partie tronquée est une zone d'interaction entre l'IGF-1 et ses IGF-BPs (Drakenberg et al. 1990). Ainsi, cette troncation limite fortement l'action des IGF-BPs sur l'IGF-1 (séquestration, augmentation de demi-vie...)

Le GPE, l'autre produit de cette troncation, a tout d'abord été considéré comme un produit non actif et rapidement dégradé. Toutefois, une étude a montré que l'administration de GPE dans une culture de neurones induit une libération de dopamine et d'acétylcholine (Nilsson-Håkansson et al. 1993). Le GPE possède des effets neuroprotecteurs. En effet, une administration de GPE après ischémie cérébrale prévient une partie des dommages cérébraux (Guan et al. 1999). De plus, sur une culture organotypique, son administration protège les neurones hippocampiques d'une toxicité induite par le NMDA (Saura et al. 1999).

Les effets du GPE au niveau cérébral ne sont pas liés à une activation du récepteur à l'IGF-1. Son mode d'action semble être lié aux récepteurs au NMDA. En effet, la molécule possède la stéréochimie parfaite pour se fixer à ces récepteurs. De plus, des auteurs suggèrent que le GPE aurait des effets similaires à l'AP-5 (acide 2-amino-5-phosphonovalérique), un antagoniste des récepteurs au NMDA (Bourguignon et Gérard 1999). Toutefois, des études montrent des effets agonistes (Ikeda et al. 1995) comme antagonistes (Bourguignon et Gérard 1999) sur ce récepteur. Son mode d'action reste encore méconnu à ce jour (Guan 2011).

5. Récepteur à l'IGF-1 et voies de signalisation

L'IGF-1 exerce son action en se fixant sur le récepteur à l'IGF-1 (IGF-1R). Ce récepteur de la famille des tyrosines kinases est une glycoprotéine hétérotétramérique constituée de deux chaînes α , extracellulaires, de 130 kDa, qui reçoivent le ligand et de deux chaînes β , transmembranaires, de 95 kDa, qui portent l'action catalytique (Figure 13). En effet, la liaison du ligand aux sous-unités α entraîne l'autophosphorylation de trois tyrosines (1135, 1131, 1136) situées dans les domaines catalytiques des sous-unités β . Cette modification de la phosphorylation induit un changement conformationnel de la protéine, augmentant son activité catalytique (Adams et al. 2000).

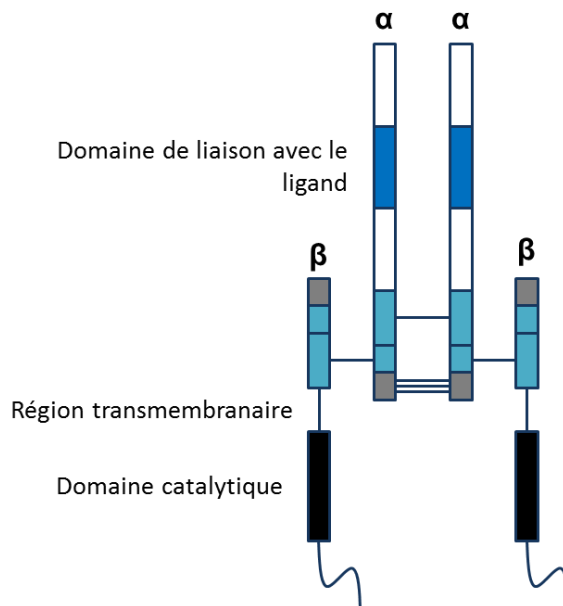


Figure 13 : Schéma du récepteur à l'IGF-1. Le domaine de liaison entre le récepteur et l'IGF-1, ainsi que le domaine catalytique qui induira la cascade de phosphorylation sont indiqués (Adapté de Adams et al. 2000).

L'IGF-1R est structurellement très similaire au récepteur à l'insuline (IR). Les deux récepteurs ont 60 % d'homologie de séquence et leurs domaines tyrosines kinases sont identiques à 84 %. Dans les cellules exprimant les deux types de récepteurs, cette forte homologie de séquence peut entraîner la formation de récepteurs hybrides possédant deux sous-unités d'un IGF-1R et deux sous-unités d'un IR (Werner et al. 2008) (Figure 14). Même si les données concernant l'affinité du récepteur hybride pour l'IGF-1 divergent, plusieurs études montrent tout de même une liaison à haute affinité (Singh et al. 2014).

La fixation du ligand entraîne la phosphorylation de tyrosines juxta-membranaires et de sérines carboxy-terminales, qui lient les protéines IRS 1 à 4 (*insulin receptor substrate*) et Shc (*Src homology and collagen domain protein*). D'une part, le recrutement des IRS permet l'activation de la voie de signalisation PI3K-AKT (*phosphatidylinositol 3-kinase* ; PKB : *protein kinase B*), ce qui se traduit par de nombreux effets favorisant globalement la survie et la différenciation cellulaire. D'autre part, la liaison avec la Shc active la voie de signalisation des MAPK, ce qui entraîne globalement une croissance et une prolifération cellulaire. Enfin, l'activation de l'IGF-1R peut induire l'activation de voies secondaires comme la voie JAK-STAT impliquées dans la transcription, ou peut agir sur l'adhésion cellulaire par l'activation de protéines telles que FAK (*Focal adhesion kinase*) et RACK1 (*Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*).

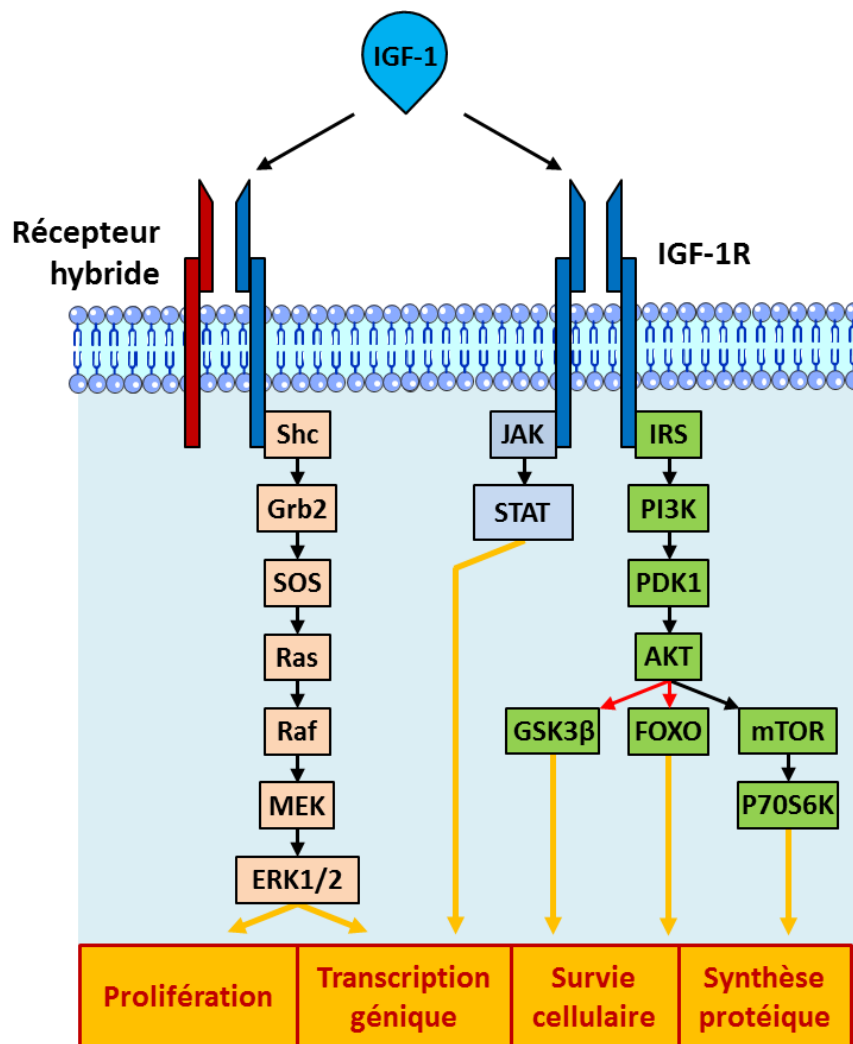


Figure 14 : Voies de signalisation de l'IGF-1R. La figure montre les IGF-1R, les récepteurs hybrides IGF-1R/récepteurs à l'insuline, et leurs principaux effecteurs. Flèches noires : activation ; flèches rouges : inhibition ; flèches jaunes : effet cellulaire.

De manière générale, les récepteurs sont exprimés dans toutes les régions cérébrales avec, toutefois, une distribution qui varie selon les structures et les étapes du développement. Chez le rat, ils apparaissent dans les neurones et les cellules gliales de la plaque du plancher (Bondy et al. 1992). Lors des derniers stades embryologiques, les IGF-1R sont fortement exprimés dans le bulbe olfactif, les plexus choroïdes, le cortex, l'hippocampe, le striatum, le septum et les noyaux gris centraux. Après la naissance, ils sont retrouvés dans les mêmes structures, bien que leurs taux diminuent graduellement. Le cervelet, au contraire des autres structures, montre une augmentation de l'expression des IGF-1R avec un pic d'expression 14 jours après la naissance de l'animal. Chez l'adulte, les IGF-1R sont présents en grande quantité dans les bulbes olfactifs, les plexus choroïdes, l'hippocampe, le cortex, l'éminence médiane et le cervelet (Kar et al. 1993) (Figure 15).

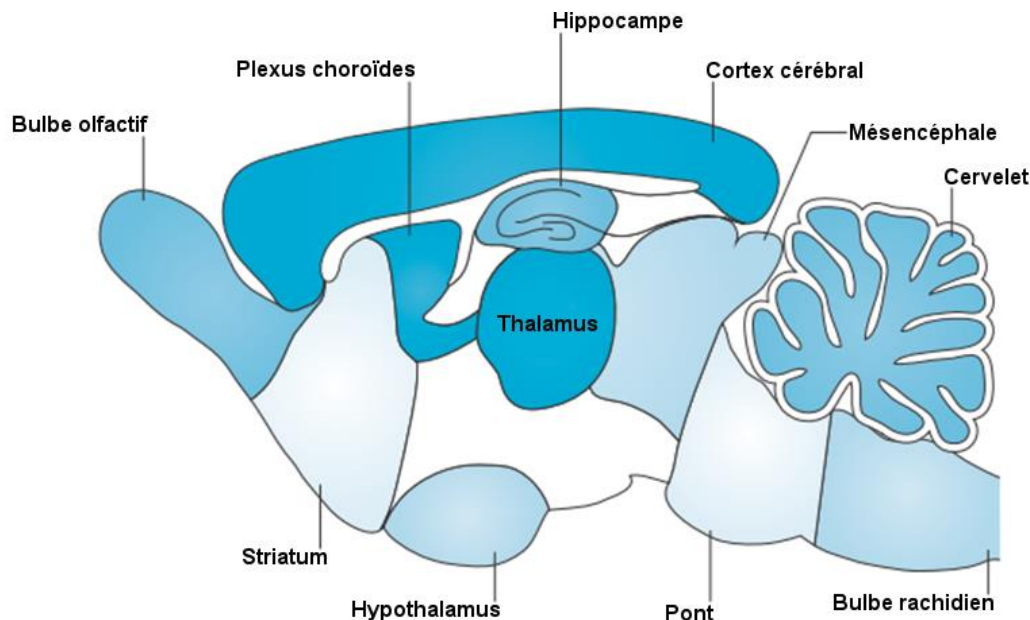


Figure 15 : Distribution des IGF-1R dans le cerveau chez le rat adulte. Les zones colorées, allant du blanc au bleu foncé, représentent des zones où l'IGF-1R est respectivement peu ou fortement exprimé. Adapté de Fernandez et Torres-Alemán 2012.

C. IGF-1 au niveau cérébral

Bien que l'IGF-1 puisse être produit par les cellules neuronales, la majeure partie de l'IGF-1 cérébral est d'origine périphérique. En effet, les effets de l'IGF-1 au niveau central sont en grande partie sous l'influence de l'IGF-1 circulant, et donc son entrée dans l'espace cérébral par la barrière hématoencéphalique (BHE) ou la barrière hémato-cérébro-spinale joue un rôle déterminant.

1. Entrée dans le système nerveux central

a. Passage de la barrière hématoencéphalique (BHE)

Comme vu précédemment, l'IGF-1 est majoritairement lié à l'IGFBP3 dans le sang. Pour être internalisé dans la BHE, l'IGF-1 doit être libéré de cette protéine de liaison. Cette libération est favorisée dans les zones du cerveau activées. En effet, lors de l'activation neuronale, du glutamate est libéré localement et permet à son tour la libération de médiateurs vasoactifs des astrocytes comme le monoxyde d'azote (NO), les dérivés de l'acide arachidonique, la prostaglandine E2 (PGE2), l'acide 11,12-époxyéicosatriénoïque (EET) et l'ATP (adénosine triphosphate). Ces médiateurs sont ensuite libérés dans le sang et stimulent l'activité de la *matrix metalloproteinase 9* (MMP9). La MMP9 clive les protéines de liaison fixées à l'IGF-1, et rend donc l'IGF-1 disponible (Figure 16).

Dans un second temps, l'IGF-1 libéré entre dans le tissu cérébral par un mécanisme de transcytose. Les cellules formant la BHE possèdent en surface des IGF-1R spécifiques associés à des LRP1 (*low density lipoprotein receptor-related protein 1*), des lipoprotéines de la classe des *low density lipoprotein* capables de transporter des molécules de part et d'autre de la membrane endothéliale. L'IGF-1, une fois fixé à son récepteur, va être internalisé et mis à disposition des cellules cérébrales (Nishijima et al. 2010).

b. Passage de la barrière hémato-cérébro-spinale

L'IGF-1 peut aussi entrer dans l'espace cérébral par la barrière hémato-cérébro-spinale et diffuser dans le liquide céphalorachidien (LCR). En effet, les cellules épithéliales formant les plexus choroïdes possèdent à leur surface un grand nombre de récepteurs à l'IGF-1. Ces récepteurs sont couplés à LRP2 (*low density lipoprotein receptor-related protein 2*), une protéine de la même famille que LRP1. Les LRP2 sont, en condition basale, inhibés par la GSk3 β (*Glycogen synthase kinase 3 β*). Quand l'IGF-1 se lie à son récepteur, il induit l'autophosphorylation de celui-ci et l'activation de la voie de signalisation PI3K-AKT. L'une des actions de la protéine AKT est l'inhibition de GSk3 β . Ainsi, l'activation des IGF-1R induit une levée d'inhibition sur LRP2 et permet la transcytose de la barrière hémato-cérébro-spinale (Carro et al. 2005).

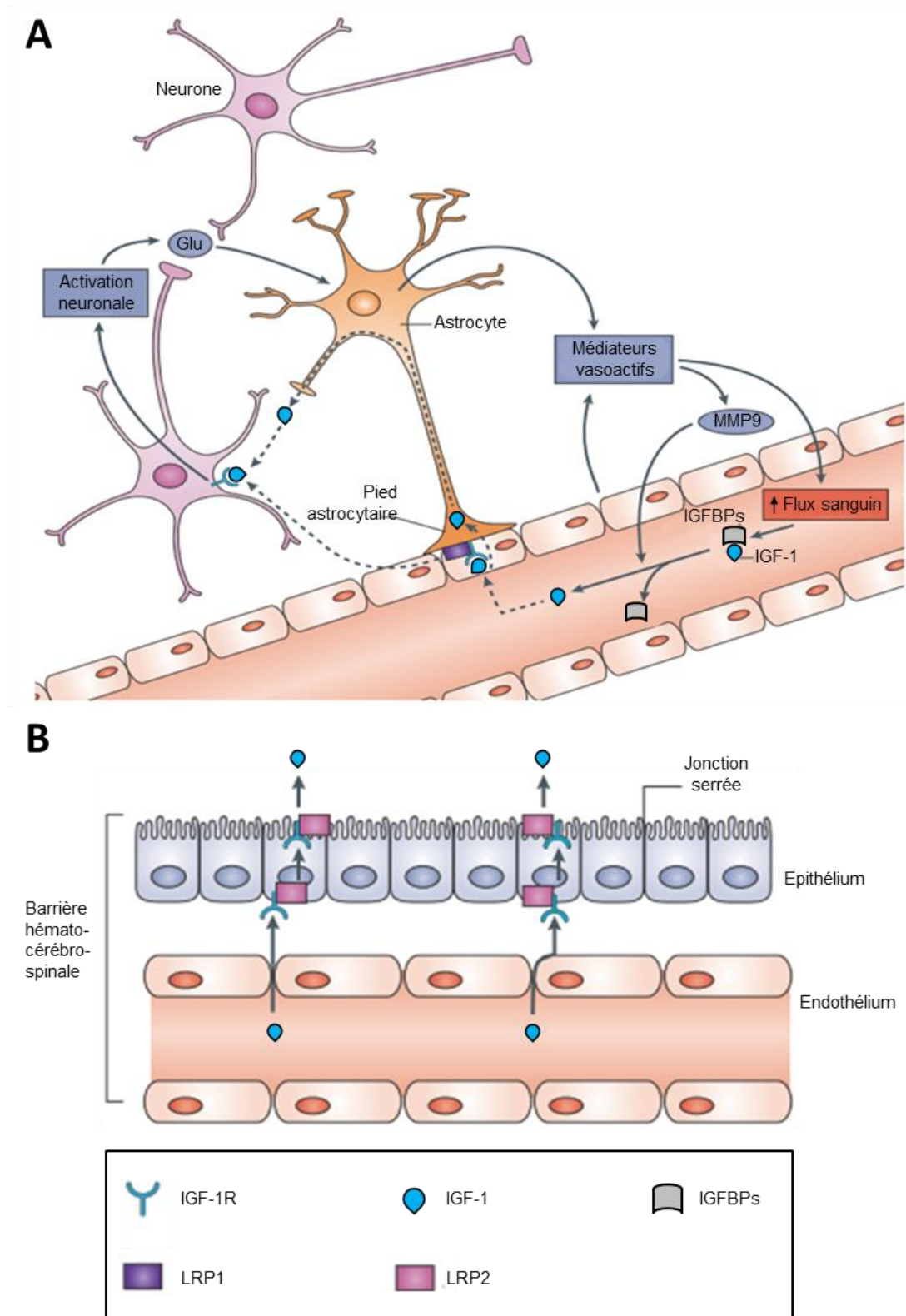


Figure 16 : Mécanismes d'entrée de l'IGF-1 périphérique dans le cerveau. A : Représentation de l'entrée d'IGF-1 par la BHE. L'activité neuronale induit la libération de médiateurs vasoactifs qui activent la MMP9. Cette protéase clive les IGFBPs sanguines, libérant localement l'IGF-1. En se fixant à son récepteur, l'IGF-1 est internalisé et mis à disposition des cellules neuronales. B : Représentation de l'entrée d'IGF-1 par la barrière hémato-cérébro-spinale. L'IGF-1 en se fixant sur son récepteur induit l'activation de la LRP2 qui permet la transcytose de l'IGF-1 et sa diffusion dans le LCR. Adapté de Fernandez et Torres-Alemán 2012.

2. Effets de l'IGF-1 sur le cerveau

Les effets de l'IGF-1 au niveau cérébral sont incontestés et bien documentés, aussi bien au cours du développement que chez l'adulte.

a. Effets de l'IGF-1 sur le développement

De l'invertébré à l'homme, l'IGF-1 est impliqué dans le développement du système nerveux central. Plusieurs études visant à sous- ou sur-exprimer l'IGF-1 lors de l'embryogenèse montrent de sévères altérations du développement cérébral. Une sous-expression du gène de l'IGF-1 induit une microcéphalie (Kappeler et al. 2008) alors qu'une surexpression du gène provoque une macrocéphalie (Ye et al. 2004). Ces observations indiquent bien un rôle prépondérant de l'IGF-1 au cours du développement cérébral. L'essentiel des données obtenues provient de modèles murins. L'IGF-1 stimule la croissance et la différenciation des neurones fœtaux (DiCicco-Bloom et Black 1988). De plus, il est nécessaire à l'organisation cérébrale (Hodge et al. 2005), en augmentant le bourgeonnement des neurites (Beck et al. 1993) et en participant à la migration des neurones GABAergiques (Oishi et al. 2009) et glutamatergiques (Hurtado-Chong et al. 2009), neurones nécessaires à la formation des circuits neuronaux. L'ajout d'IGF-1 sur des cultures de neurones pyramidaux issus de l'hippocampe induit la croissance de l'axone en favorisant l'expansion du cône de croissance (Laurino et al. 2005). L'IGF-1 est également à l'origine du développement (Cheng et al. 2001) et de la synaptogenèse hippocampiques (O'Kusky et al. 2000).

b. Effets de l'IGF-1 au niveau cellulaire

Plusieurs études montrent un effet de l'IGF-1 sur la **morphologie neuronale**. En effet, une augmentation du diamètre axonal est observée chez des souris surexprimant l'IGF-1 (Ye et al. 1995) et la longueur comme la myélinisation des axones sont réduites chez des souris n'exprimant pas l'IGF-1 (Beck et al. 1995). De plus, le volume du neuropile augmente chez des souris surexprimant l'IGF-1 alors qu'il diminue si l'action de l'IGF-1 est inhibée (Gutiérrez-Ospina et al. 1996). Enfin, au niveau cortical, Niblock et ses collaborateurs ont mis en évidence sur des tranches de cerveau de rat nouveau-nés qu'un traitement à l'IGF-1 induit une augmentation du nombre et de la longueur des dendrites (Niblock et al. 2000).

De plus, l'IGF-1 augmente l'**excitabilité neuronale**. En effet, lorsqu'il est appliqué sur des neurones en culture, l'IGF-1 augmente l'activité de canaux calciques (Blair and Marshall 1997) et inhibe celle des canaux potassiques (Nuñez et al. 2003). Ces variations induisent une diminution du potentiel de membrane des neurones, qui régit l'excitabilité neuronale. Ainsi, des études ont montré que l'IGF-1 augmente l'excitabilité des neurones des noyaux des colonnes dorsales (Nuñez et al. 2003) ou du cervelet (Carro et al. 2000). De plus, l'IGF-1 augmente l'activité basale des cellules de Purkinje cérébelleuses chez le rat adulte (Carro et al. 2000) ou des neurones de l'hippocampe en culture (Xing et al. 2007).

L'IGF-1 module également la **transmission synaptique**. Sur des neurones cérébelleux en culture, il a été montré que l'IGF-1 induit une dépression des courants AMPA dépendants (*α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*), une internalisation des récepteurs AMPA (Wang et Linden 2000), sans affecter les récepteurs NMDA (acide N-méthyl-D-aspartique), mais en potentialisant l'activité des récepteurs kaïnate (Gonzalez de la Vega et al. 2001). Nombre d'effets de l'IGF-1 au niveau cérébral sont liés au GABA (acide γ -aminobutyrique). En effet, la plasticité corticale induite par une administration d'IGF-1 est accompagnée d'une diminution des taux de GABA (Maya-Vetencourt et al. 2012). L'activation des récepteurs GABA_B induit la transactivation des IGF-1R par des mécanismes indépendants de l'IGF-1 (Tu et al. 2010). Enfin, une étude récente réalisée sur des tranches de bulbe olfactif prélevées à P14-P16 a montré que l'IGF-1 pouvait être sécrété au niveau de la fente synaptique sous l'action de la synaptotagmine-10 et de mécanismes calciques (Cao et al. 2011). Toutefois, les effets potentiels de l'IGF-1 en tant que neurotransmetteur sont encore méconnus.

Enfin, l'IGF-1 est impliqué dans le **métabolisme du glucose** au niveau cérébral. En effet, l'IGF-1 en se fixant à son récepteur induit l'activation de la cascade de phosphorylation PI3K-AKT. La phosphorylation d'AKT induit la translocation de transporteurs de glucose (GLUT4 ; Glucose Transporter type 4) du milieu intracellulaire à la membrane plasmique, ce qui permet l'entrée de glucose dans la cellule (Bondy et Cheng 2004).

c. Effets de l'IGF-1 sur l'angiogénèse

La formation des vaisseaux sanguins a lieu lors du développement. Toutefois, à l'état adulte, de nouveaux vaisseaux sanguins sont créés pour répondre à des stimuli spécifiques.

Par exemple, l'exercice physique induit la formation de nouveaux vaisseaux sanguins cérébraux. Cet effet est inhibé chez des souris ayant des taux d'IGF-1 bas (Lopez-Lopez et al. 2004). Chez cette même espèce, l'ajout d'un antagoniste des IGF-1R limite la néo-vascularisation de la rétine en inhibant la production de VEGF (*vascular endothelial growth factor*) (Smith et al. 1999). Chez le rat, le taux d'IGF-1 est corrélé aux remodelages vasculaires liés à l'âge (Sonntag et al. 1997). De plus, une administration d'IGF-1, par administration locale ou par production via l'action d'un vecteur adénoviral, stimule l'angiogenèse et la néo-vascularisation (Su et al. 2003). De même, chez le bovin, l'IGF-1 stimule la migration des cellules vasculaires endothéliales permettant la formation du vaisseau sanguin (Nakao-Hayashi et al. 1992). Ainsi, l'IGF-1 apparaît comme un acteur essentiel de l'angiogenèse chez l'adulte (Lopez-Lopez et al. 2004).

d. Effets de l'IGF-1 sur les capacités cognitives

Chez l'homme, la diminution des taux d'IGF-1 semble directement corrélée à l'altération des capacités mnésiques liée à l'âge. En effet, les personnes âgées présentant des taux d'IGF-1 élevés ont de meilleures performances à des tests mesurant la performance sensorimotrice ou évaluant différentes fonctions cognitives affectées par le vieillissement (mémoire visuelle, verbale, vitesse de traitement de l'information...) (Morley et al. 1997; Aleman et al. 1999). Une corrélation similaire est observée entre l'IGF-1 et l'intelligence fluide (capacité de faire des inférences et de comprendre la relation entre différents concepts indépendamment des connaissances acquises) (Aleman et al. 2001) ou l'apprentissage visuel et auditif (Morley et al. 1997). De plus, un traitement à l'hormone de croissance sur patients adultes déficients en GH a permis d'observer, après un an, une amélioration de la mémoire (Deijen et al. 1998). Cet effet a été attribué à l'augmentation des taux d'IGF-1 induite par le traitement.

Chez l'animal, de faibles taux d'IGF-1 limitent la mémoire spatiale alors qu'une administration d'IGF-1 restaure ces facultés (Trejo et al. 2008). Ces améliorations sont dues à l'implication de l'IGF-1 dans la neurogenèse hippocampique (Aberg et al. 2006). Des troubles de la mémoire observés chez l'animal âgé (Markowska et al. 1998) sont corrélés à une diminution des taux d'IGF-1 au cours du vieillissement (Florini et al. 1981). Une administration intracérébroventriculaire d'IGF-1 permet de prévenir ces altérations (Markowska et al. 1998). Les effets bénéfiques de l'IGF-1 sur les fonctions cognitives

pourraient s'expliquer par le fait que cette substance permet de prévenir certains changements synaptiques (Sonntag et al. 2000), tels qu'une sous-expression de certaines sous-unités des récepteurs au NMDA (NR1, NR2A, NR2B) ou AMPA (GluR2) dans l'hippocampe de rats âgés (Adams et al. 2008).

Diverses situations pathologiques sont directement liées à une altération des taux d'IGF-1. En effet, des études épidémiologiques ont observé un lien entre des altérations cognitives (démence, déclin cognitif lié à l'âge) et une altération du métabolisme de l'IGF-1 (Aleman et al. 1999 ; Garcia et al. 2006). De plus, une altération des taux d'IGF-1 est trouvée aux stades les plus précoces de la maladie d'Alzheimer (Watanabe et al. 2005). L'IGF-1 jouant un rôle dans l'élimination des plaques séniles (Carro et al. 2002), une diminution des taux d'IGF-1 semble être l'une des causes de cette maladie neurodégénérative. Enfin, une étude clinique montre que le déclin cognitif des patients atteints par la maladie d'Alzheimer est directement associé à la diminution des taux d'IGF-1 (Duron et al. 2012).

3. Interactions de l'IGF-1 avec les neurotrophines

Au cours des dernières années, deux théories ont vu le jour sur l'impact de l'IGF-1 au niveau cérébral. La première considère l'IGF-1 comme un simple acteur faisant partie d'un réseau complexe d'interactions entre différentes neurotrophines. Ainsi, dans cette théorie, de nombreuses molécules établissent entre elles un petit nombre d'interactions (Figure 17). D'un autre côté, plusieurs auteurs tendent vers un rôle plus central de l'IGF-1 (Torres-Aleman 2010). Cette théorie considère l'IGF-1 comme un facteur central pouvant établir de nombreuses connexions entre les stimuli extérieurs et d'autres composants moléculaires du système. C'est ce que l'on appelle un « Noyau » (Figure 17). Cette seconde théorie est étayée par plusieurs études, qui démontrent que l'IGF-1 agit sur de nombreuses autres substances sans être affecté en retour. L'administration d'IGF-1 augmente les taux de VEGF dans l'hippocampe comme dans le cervelet (Lopez-Lopez et al. 2004). L'IGF-1 induit également une augmentation des taux de BDNF (*brain derived neurotrophic factor*) dans l'hippocampe (Carro et al. 2000). De plus, les effets connus du BDNF au niveau cérébral sont

dépendant de l'IGF-1. Ainsi, bloquer les récepteurs à l'IGF-1 (Ding et al. 2006), ou l'entrée d'IGF-1 au niveau cérébral (Chen et Russo-Neustadt 2007), inhibe les actions du BDNF et des molécules associées (Synapsine 1, GAP43). Malgré ces liens entre IGF-1 et BDNF ou VEGF, ces deux molécules ne semblent pas avoir d'effet en retour sur l'IGF-1. Enfin, plusieurs études montrent un effet de l'IGF-1 entrant en synergie avec d'autres molécules. Ainsi, l'effet du NGF (*nerve growth factor*) sur la croissance des neurites est potentialisée (Jones et al. 2003) tout comme les effets trophiques du FGF-2 (*fibroblast growth factor 2*) sur la croissance neuronale de cellules hippocampiques (Torres-Aleman et al. 1990).

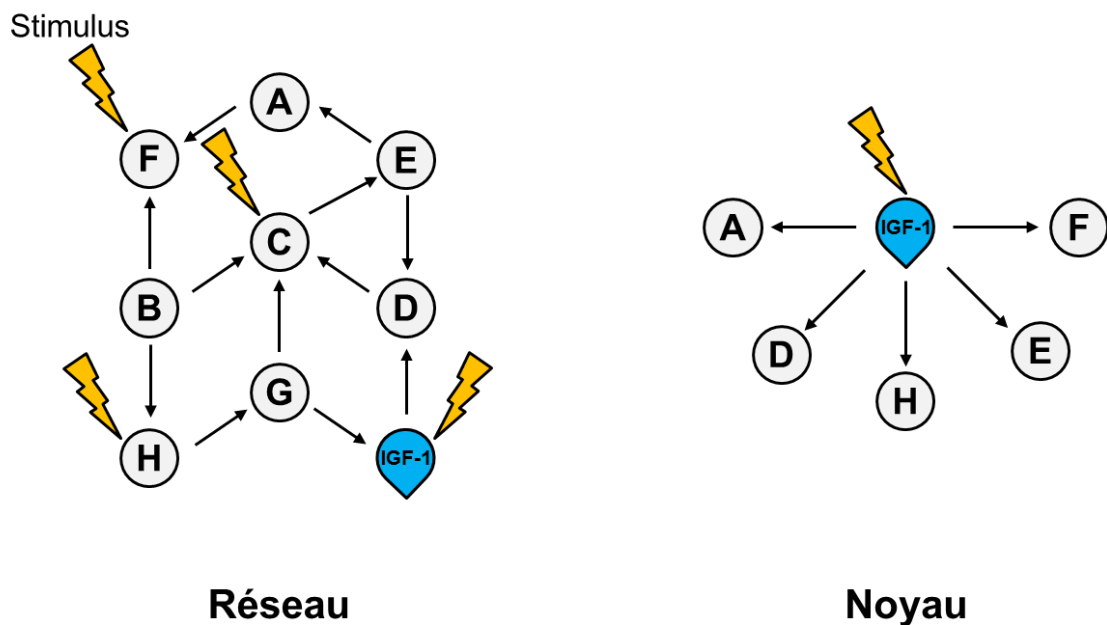


Figure 17 : Modèles d'interactions entre l'IGF-1 et d'autres neurotrophines. Le modèle « Réseau » donne le même poids à chaque neurotrophine. Dans ce modèle l'IGF-1 n'est qu'un membre du système global. Dans le modèle « Noyau », l'IGF-1 serait le médiateur des effets des autres neurotrophines (Torres-Aleman 2010).

D. IGF-1 et exercice physique

L'exercice physique est connu pour avoir de nombreux effets bénéfiques, notamment au niveau cérébral. Plusieurs auteurs suggèrent que l'essentiel de ces effets serait dû à l'IGF-1, et nombre de publications dans ce domaine partent de l'idée que l'exercice augmente les taux circulants et cérébraux d'IGF-1. Pourtant, les données de la littérature sont loin d'être unanimes.

1. Effets de l'exercice sur les taux d'IGF-1

Chez l'homme, plusieurs études montrent un lien entre les taux d'IGF-1 et l'exercice physique. Toutefois, un effet sur la production d'IGF-1 reste sujet à débat. En effet, les études sur l'effet de l'exercice sur les taux d'IGF-1 plasmatiques sont souvent contradictoires. Ainsi, l'exercice peut augmenter (Schwarz et al. 1996), diminuer (Alemany et al. 2008), ou ne pas avoir d'effet sur les taux d'IGF-1 (Kanaley et al. 2005). Cette variation semble être en partie due au type d'exercice, au sexe, ou à l'âge des sujets. De plus, l'activité physique module aussi les taux d'IGFBPs. Un exercice prolongé (Chicharro et al. 2001) comme bref (Wallace et al. 1999) induit une forte augmentation des taux d'IGFBP-1. Plusieurs études se sont intéressées aux effets de l'exercice sur l'IGFBP-3 mais les résultats sont aussi variés que pour les taux d'IGF-1. Ainsi, l'activité physique augmente l'activité des IGFBP-3 (Nemet et al. 2002), ou ne l'affecte pas (Dall et al. 2001). Comme pour l'IGF-1, cette variabilité semble être due au type d'exercice ou à l'entraînement des sujets (Rosendal et al. 2002).

Les données obtenues sur des modèles animaux sont tout aussi confuses. En effet, Eliakim et collaborateurs (1997) ont montré qu'il n'y avait pas de variation des taux d'IGF-1 après un exercice bref, ou un entraînement d'une semaine. Un entraînement de 4 semaines entraîne, quant à lui, une diminution significative des taux d'IGF-1 plasmatiques (Leme et al. 2007) et un retour à l'état basal est observé après un entraînement de 6 (Bravenboer et al. 2001; Gomes et al. 2006) ou 8 (Leme et al. 2009) semaines. Toutefois, un entraînement de très longue durée, semble induire une diminution globale des taux d'IGF-1 plasmatiques (Matsakas et al. 2004). Dans le muscle, un exercice bref n'induit pas d'augmentation des taux d'IGF-1 musculaires. Toutefois, un entraînement d'une semaine induit une augmentation de ces taux sans que celle-ci ne soit couplée à une augmentation des taux

d'ARN messagers (Eliakim et al. 1997). Ainsi, cette observation suggère que, bien que le muscle produise de l'IGF-1, son origine est majoritairement circulante pendant l'effort.

Si la relation entre les taux plasmatiques d'IGF-1 et l'exercice physique est toujours sujette à débat, il semble en revanche que les choses soient plus claires dans le système nerveux central. En effet, l'activité physique chez l'animal induit une augmentation des taux d'IGF-1 cérébraux, d'une part grâce à une entrée accrue au niveau des plexus choroïdes (Carro et al. 2000) ou de la BHE (Nishijima et al. 2010), et d'autre part grâce à une augmentation de l'expression de la protéine, démontrée au niveau de l'hippocampe (Ding et al. 2006).

2. Effets bénéfiques de l'exercice sur le cerveau

Une activité physique régulière semble être associée à de plus faibles risques de développement de pathologies neurologiques telles que la maladie de Parkinson (Smith et Zigmond 2003), la maladie d'Alzheimer (Cotman et Berchtold 2002), les ischémies cérébrales (Stummer et al. 1994) ou la dépression (Byrne et Byrne 1993). Aussi de nombreuses études cherchent à comprendre les mécanismes liés aux effets bénéfiques de l'exercice physique au niveau cérébral. Sung et collaborateurs ont montré qu'un exercice régulier (30 min / jour, 5 jours / semaine) améliore le comportement moteur de souris MPTP, un modèle murin de la maladie de Parkinson (Sung et al. 2012). De plus, sur un modèle animal de dépression, l'exercice (60 min / jour, 5 jours / semaine, 4 semaines) induit une diminution des taux de molécules pro-inflammatoires et diminue le comportement dit « dépressif » (Liu et al. 2013). Outre ses effets neuroprotecteurs, l'exercice est aussi responsable de mécanismes plastiques dans le cerveau. Ainsi, il favorise l'apprentissage (van Praag et al. 1999) par une augmentation de la neurogenèse hippocampique (Leuner et al. 2006).

Ces différents effets bénéfiques de l'exercice sur le cerveau semblent s'exercer par l'intermédiaire de l'IGF-1. Il existe plusieurs arguments étayant cette hypothèse. Tout d'abord, comme indiqué ci-dessus, l'exercice augmente les taux d'IGF-1 dans le cerveau. Par ailleurs, la neurogenèse hippocampique (Trejo et al. 2001), la production de neurotrophines (BDNF, NGF, FGF2) (Neeper et al. 1995, 1996 ; Gómez-Pinilla et al. 2001), la réorganisation

vasculaire (Lopez-Lopez et al. 2004), ou encore les effets anxiolytiques (Llorens-Martín et al. 2010) induits par l'exercice, sont connus pour être également modulés par l'IGF-1. Enfin, l'inhibition du système IGF-1 prévient les effets bénéfiques de l'exercice. Par exemple, la neurogenèse hippocampique induite par l'exercice est inhibée après injection d'un sérum anti-IGF-1 (Carro et al. 2000) ; l'utilisation d'un anticorps inhibant les récepteurs à l'IGF-1 au niveau de l'hippocampe, inhibe les effets de l'exercice sur la rétention d'information, via une action sur le BDNF et les protéines impliquées dans la plasticité synaptique (synapsine 1, *calmodulin-dependent protein kinase II*, MEK : *mitogen signal-regulated kinase*) (Ding et al. 2006).

L'IGF-1 apparaît donc comme étant un acteur-clé dans la régulation des effets de l'activité physique au niveau cérébral, il semble être le médiateur de l'exercice physique sur de nombreuses cibles moléculaires. Cette vision centrale du rôle de l'IGF-1 correspond parfaitement au modèle de « Noyau » présenté au paragraphe II.3. Toutefois, si les effets de l'exercice physique sur l'IGF-1 sont bien documentés, à l'inverse, les conséquences d'une hypoactivité restent mal connues. Ce point sera détaillé au paragraphe III.C.

III. L'hypodynamie-hypokinésie

A. Définition

L'hypodynamie-hypokinésie (HH) se caractérise par une diminution des charges corporelles s'exerçant sur les membres inférieurs (hypodynamie) et une réduction de l'activité motrice (hypokinésie). Ainsi, l'HH est une composante de certaines situations réelles telles que l'alitement prolongé, l'immobilisation par plâtre, ou encore un séjour en microgravité.

1. Les situations d'HH chez l'humain

Lors de traumatismes (fractures, lésions musculaires, tendineuses...) ou de maladies sévères, un **alitement prolongé** est nécessaire pour l'individu. Cette position permet d'ôter les tensions infligées sur les tissus lésés et permettre leur récupération.

L'immobilisation par **plâtre** est, elle aussi, considérée comme une situation d'HH. Lors d'une fracture des membres supérieurs comme inférieurs, le membre est immobilisé et maintenu, limitant donc l'activité de celui-ci. De plus, dans le cas d'un plâtre des membres inférieurs, on observe une forte diminution de l'action des forces gravitaires s'exerçant sur les muscles, notamment posturaux.

Sur Terre, notre organisme est constamment soumis à la force de gravitation. En revanche, lors d'un **vol spatial**, notre corps est soumis à une période de micropesanteur, c'est-à-dire à une période pendant laquelle l'ensemble des forces gravitaires s'exerçant sur le corps sont quasi nulles. Pendant cette période, les pieds ne sont plus en contact avec le sol, aucune charge corporelle ne s'exerce sur les membres inférieurs et leur activité motrice est fortement réduite.

Toutes ces situations d'HH modifient donc grandement l'utilisation des membres inférieurs à des fins motrices, mais aussi l'ensemble des afférences sensorielles (extéroceptives et proprioceptives). Cette modification d'utilisation entraîne une altération très marquée des systèmes musculaires et nerveux.

2. Les modèles humains d'hypodynamie-hypokinésie

a. L'alitement prolongé

Les agences spatiales européenne (ESA), française (CNES), américaine (NASA) ou japonaise (NASDA) utilisent un modèle d'alitement prolongé (« *bed rest* ») dans le but de mimer les effets de la microgravité chez l'humain. Dans ce modèle, les sujets sont placés sur un lit ayant une inclinaison de -6° par rapport à l'horizontale pour une durée de quelques heures à plusieurs mois. Cette position est dite « anti-orthostatique », c'est-à-dire tête plus basse que les pieds.

b. L'immersion sèche

Certaines équipes utilisent un autre modèle expérimental d'étude de la physiologie spatiale humaine, le modèle d'immersion sèche (« *dry immersion* »). Dans cette situation, le corps repose sur une bâche étanche tendue à la surface d'une piscine remplie d'eau dont la température est maintenue à 37°C . Cette situation permet de réduire de façon considérable la charge imposée aux muscles posturaux.

c. La suspension d'un membre

Un modèle de suspension du membre inférieur chez l'homme a été mis au point par Tesch et collaborateurs (1991). Il s'agit d'un modèle de suspension unilatérale de la jambe vers l'arrière, au moyen d'un harnais. La semelle de la chaussure de l'autre jambe est fortement épaissie afin de permettre l'extension du membre suspendu. Le sujet se déplace au moyen de béquilles. Ce modèle permet de supprimer la charge corporelle s'exerçant sur un membre et de limiter les mouvements, sans pour autant bloquer totalement l'articulation. Il entraîne également le développement des perturbations musculaires (atrophie, diminution de la force de contraction) comparables à celles observées à la suite d'un alitement prolongé (Berg et al. 1991).

3. Les modèles animaux

a. Elévation du train postérieur

Afin de mieux appréhender les effets de ces situations d'HH, des modèles animaux sont couramment utilisés en laboratoire. Le plus utilisé est un modèle d'élévation du train postérieur de l'animal par la queue (Morey-Holton and Globus 2002) ou par un système de harnais (Musacchia et al. 1980). Dans ces modèles, les pattes postérieures ne sont plus en contact avec le sol et les déplacements sont réalisés par les pattes antérieures. De plus, l'inclinaison du corps induit un déplacement des liquides corporels vers la partie thoraco-céphalique, ce qui est également observé lors d'un séjour en microgravité chez l'homme.

b. Immobilisation

Un modèle d'immobilisation unilatérale est aussi utilisé afin d'appréhender les effets de l'HH (Lindgren, 1977). Dans ce modèle, l'une des pattes du rat est immobilisée contre l'abdomen par un bandage adhésif pendant une période de 5 jours à 8 semaines. Le coté controlatéral est parfois utilisé comme contrôle.

c. Contention

Ce modèle a été utilisé par Sala-Catala et collaborateurs (2005). Il consiste à restreindre les mouvements de jeunes rats âgés de 20 jours, en les plaçant dans de petites cages de 5 x 7 x 7 cm pour une durée variant de 10 à 100 jours. La paroi postérieure peut être bougée de telle sorte que la taille de la boîte évolue au fur et à mesure que l'animal grandit.

B. Effets de l'HH sur le système sensorimoteur

Chez l'homme comme chez l'animal, les situations d'HH sont connues pour induire un grand nombre de perturbations de différents systèmes physiologiques (déplacement des fluides corporels vers la partie thoraco-céphalique, altération des systèmes musculaire, osseux, nerveux, immunitaire ou hormonal...) (pour revue Nicogossian 1994). Ces altérations vont entraîner de sévères altérations de l'activité motrice. En effet, chez le rat, l'activité motrice spontanée est fortement diminuée après une période d'HH (Canu et al. 2007a).

1. Muscle et HH

L'HH entraîne un grand nombre de perturbations du système musculaire. Un séjour en microgravité de courte durée (8 jours) induit une diminution du volume des muscles des jambes et du dos de 4 à 10 % (LeBlanc et al. 1995). Cette diminution est accentuée pour les séjours de plus longue durée : le mollet perd de 6 à 20 % de son volume après 6 mois de microgravité (Zange et al. 1997). Les muscles posturaux sont les plus affectés (muscle ischio-jambier : -8,3 % ; muscles du dos : -10,3 %) (LeBlanc et al. 1995). Un séjour de longue durée (140 à 175 jours) entraîne en outre une perte de force de 35 % au niveau des muscles des membres inférieurs (muscles tibial antérieur et muscle gastrocnémien) (Kozlovskaya et al. 1981). Un séjour en microgravité induit également des changements phénotypiques. En effet, 11 jours de microgravité diminue le nombre de fibres musculaires lentes de 8 % et augmente le nombre de fibres rapides de 9 % dans le muscle vaste latéral (Edgerton et al. 1995). On observe également diminution de l'expression des isoformes lentes des chaînes lourdes de myosine de 12 % et une augmentation correspondante des isoformes rapides (Widrick et al. 1999).

Ces changements obtenus après 17 jours de vol spatial sont similaires à ceux obtenus après 17 jours d'alitement prolongé (Widrick et al. 1999). En effet, un alitement prolongé induit, lui aussi, une sévère perte de force (de 15 à 45 % selon les muscles et la durée de l'alitement), une atrophie musculaire principalement marquée sur les muscles posturaux et une transition des fibres lentes vers des fibres rapides (pour revue, Brower 2009).

Chez le rat, 15 jours d'HH par élévation du train postérieur, entraînent une atrophie des muscles des membres postérieurs et plus particulièrement des muscles posturaux tels que le muscle soléaire (Stevens et al. 1990). De plus, l'étude chez l'animal a permis de révéler une altération des propriétés mécaniques du muscle. La tension maximale diminue de façon très significative (-42 %) (Leterme et al. 1991). Elle est associée à une diminution de la force musculaire, de la résistance du muscle à la fatigue, et de sa consommation maximale en oxygène (Desplanches et al. 1987). L'atrophie induite par l'HH est principalement liée à une diminution de la surface transversale des fibres musculaires de type I et non à un changement du nombre ou de la longueur des fibres. Les fibres de type II ne semblent que peu affectées par l'HH (Templeton et al. 1988). Les fuseaux neuromusculaires sont eux aussi

touchés par l'HH : de nombreuses modifications structurelles (Jozsa et al. 1988) du fuseau et une altération des propriétés histochimiques des fibres intrafusales (modification des isoformes des chaînes lourdes de myosine) (De-Doncker et al. 2002) ont été décrites après 1 à 3 semaines d'immobilisation. Ainsi, bien que le nombre de fuseaux neuromusculaires ne soit pas modifié par une période d'HH (De-Doncker et al. 2002), une période de 14 (De-Doncker et al. 2003) ou 21 (Rosant et al. 2006) jours d'HH entraîne une augmentation de la sensibilité à la vitesse d'étirement du muscle, de la sensibilité aux vibrations, ainsi de l'amplitude de la réponse nerveuse.

2. Nerf, moelle épinière, et HH

Plusieurs études réalisées chez le rat ont montré que les nerfs conduisant les informations sensorielles provenant du muscle comme les commandes motrices, et la moelle épinière, sont aussi impactés par une période d'HH ou de microgravité de 14 jours.

Nerfs. L'HH induit une diminution de la vitesse de conduction des nerfs sciatique et soléaire (Canu et al., 2009) ou de la racine dorsale L5 (Ren et al. 2012). Cette altération semble due à des modifications de la gaine de myéline. En effet, son épaisseur est réduite dans le nerf soléaire après une période d'HH (Canu et al. 2009), et des signes de dégénérescence apparaissent au niveau de la racine dorsale L5 (Ren et al. 2012).

Ganglions spinaux. Une période de 14 jours de microgravité induit une diminution du volume du nucléole, du noyau et du corps cellulaire des neurones de gros diamètre, ainsi qu'une diminution du nombre de cellules gliales (Krasnov 1994). D'un point de vue sensoriel, les neurones des ganglions de la racine dorsale ont des potentiels d'action plus longs, une repolarisation plus lente et des seuils d'activation plus faibles après HH (Ren et al. 2012).

Moelle épinière. La structure des motoneurones α est elle aussi modifiée par une période d'inactivité. En effet, 14 jours d'HH diminuent de 19 % la taille du corps cellulaires des motoneurones α (De-Doncker et al. 2006). De plus, le séjour en microgravité altère les capacités oxydatives des neurones de la moelle épinière au niveau L5. En effet, Ishihara et collaborateurs (1997) ont montré une diminution de l'activité de la succinate déshydrogénase (SDH) des neurones des cornes ventrale et dorsale. Les propriétés

électrophysiologiques des motoneurones innervant les membres postérieurs sont aussi altérées après une période d'HH. Cormery et ses collaborateurs (2005) ont montré qu'après 2 semaines d'HH, les motoneurones α du nerf tibial ont une rhéobase plus élevée, les rendant moins excitables ; l'amplitude de l'hyperpolarisation qui suit le potentiel d'action ("*after hyperpolarisation*") est plus faible et la fréquence de décharge des petits motoneurones innervant les fibres lentes est augmentée, rendant leurs caractéristiques proches des gros motoneurones qui innervent quant à eux les fibres rapides. Une augmentation des taux de la protéine Fos, marqueur de l'activité neuronale, est observée dans la corne dorsale de la moelle épinière (Langlet et al. 2001), ce qui suggère une plus forte activation des neurones. Enfin, l'HH modifie les taux de neurotransmetteurs de la moelle épinière. Sept jours d'HH augmentent les taux de deux neurotransmetteurs excitateurs (glutamate et aspartate) et de deux neurotransmetteurs inhibiteurs (glycine et GABA). Toutefois, ces taux reviennent à des valeurs contrôles après 14 jours d'HH (Treffort et al. 2006).

3. Réflexe et HH

Le réflexe de Hoffman (réflexe H) est habituellement utilisé pour évaluer l'excitabilité des motoneurones spinaux (Zehr, 2002). Le principe consiste à stimuler électriquement un nerf mixte, transportant des informations sensorielles comme motrices, et à enregistrer la réponse musculaire par électromyographie. Après stimulation, deux réponses sont observées. La première, dite tardive (≈ 10 ms chez le rat ; réponse H) apparaît à de faibles intensités électriques. Cette réponse est liée à la stimulation des fibres sensorielles du nerf mixte qui stimule à son tour le motoneurone α . Le temps de latence est plus élevé car l'information remonte tout d'abord à la moelle épinière pour repartir vers le muscle via le neurone moteur (motoneurone α). La seconde réponse, dite précoce (≈ 5 ms chez le rat ; réponse M) nécessite de plus fortes intensités de stimulation. L'apparition de cette seconde réponse, plus rapide, voit la disparition progressive de la première. Cette disparition est due aux potentiels d'action antidromiques provenant de la stimulation de la fibre motrice. Le ratio entre ces deux réponses (H_{max}/M_{max}) permet d'évaluer l'excitabilité du motoneurone α . Chez l'homme, Rüegg et collaborateurs (1997) ont montré qu'une période

de microgravité induit une augmentation de ce ratio H_{max} / M_{max} . Duchateau (1995) a observé des effets similaires après 5 semaines d'alitement prolongé sur les muscles soléaire et gastrocnémien. Il faut noter toutefois que Yamanaka et collaborateurs (1999) ont montré une forte diminution du réflexe H sur le muscle soléaire après 20 jours d'alitement.

Chez le rat, l'HH diminue le seuil d'activation de 30% ainsi que l'intensité maximale du réflexe H de 27% (De-Doncker et al. 2006). De plus, le ratio H_{max} / M_{max} est augmenté dans le triceps sural après 3 semaines d'HH (Anderson et al. 1999).

Le réflexe T ou ostéotendineux est, quant à lui, obtenu après l'application d'un stimulus mécanique sur un tendon ; la réponse est enregistrée par électromyographie. Une période d'HH de 3 semaines induit une forte inhibition du réflexe T au niveau du tendon d'Achille (Anderson et al. 1999). Ces résultats trouvent probablement leur origine dans l'apparition de changements structurels au niveau des organes tendineux de Golgi (Jozsa et al. 1988) et une diminution la rigidité du tendon d'Achille (Almeida-Silveira et al. 2000).

4. Activité posturale et HH

L'activité posturale à deux fonctions essentielles : lutter contre les effets de forces externes comme la gravité ou les accélérations, et coordonner le maintien de l'équilibre du corps lors d'un mouvement. L'activité musculaire qui permet la posture est quasi-permanente, on parle de tonus musculaire. Cette activité est constamment soumise à des ajustements chargés de compenser les perturbations de la posture pouvant se traduire par une perte d'équilibre. Les centres nerveux contrôlant ces ajustements posturaux sont, pour l'essentiel, localisés dans le tronc cérébral.

En condition d'HH, un déséquilibre postural est observé. En effet, les premières études menées sur des spationautes ont démontré de sévères problèmes posturaux. En 1977, Homick et Reschke ont montré que les sujets avaient des difficultés à maintenir une posture stable les yeux fermés après 28 à 84 jours dans l'espace. Par la suite, Kozlovskaya et collaborateurs (1981) ont évalué l'équilibre des spationautes en mesurant au moyen d'une plateforme de force la variation de la position de leur centre de gravité, avant et après un séjour de longue durée (\approx 6 mois) en microgravité. La variation du centre de gravité est

augmentée, ce qui est le signe de troubles posturaux. Cette instabilité posturale est depuis caractérisée par l'utilisation du SOT (*sensory organization test*). Ce test non invasif permet de caractériser la réponse posturale du sujet par un score en condition basale ou avec un mouvement de balancement, les yeux ouverts ou clos. Après un séjour en microgravité, les sujets soumis au SOT ont un score plus faible, représentatif de cette instabilité (Cohen et al. 2012). Ces troubles sont en partie expliqués par une altération du système musculaire mais aussi par une altération du système vestibulaire. En effet, il a été reporté un certain nombre de troubles vestibulo-oculaires après une période de microgravité (illusions d'orientation visuelle, sensations d'auto-inversion, vertiges...). L'origine de ces phénomènes résulte d'une sous-activation des récepteurs au niveau du vestibule qui détecte, en condition basale, la gravité (Nicogossian 1994).

Des études menées chez le rat ont cherché à évaluer les effets de l'HH sur leur posture. En condition contrôle, le rat est en position plantigrade. Dans cette position, la cheville fait un angle de 30 à 40°. Après 7 ou 14 jours d'HH, une hyperextension de la cheville est observée (90°) amenant une transition d'une posture plantigrade à une posture digitigrade. En outre, selon les rats, les pattes postérieures sont en abduction, ou au contraire en adduction (Canu et Falempin 1996).

5. Locomotion et HH

La locomotion est une fonction motrice qui assure le déplacement actif de l'organisme dans son environnement. Chaque cycle locomoteur peut être divisé en deux phases selon que la patte est ou n'est pas en contact avec le sol. Pendant la phase de transfert, la patte quitte le sol et est amenée vers l'avant, vers son prochain point d'appui. Cette phase est essentiellement sous l'influence de muscles fléchisseurs afin de garder la patte au-dessus du sol. La phase d'appui débute dès que la patte entre en contact avec le sol. C'est cette phase qui va permettre à l'animal de se propulser vers l'avant. Elle met essentiellement en jeu les muscles extenseurs. La locomotion nécessite une coordination complexe afin d'assurer la contraction des différents muscles impliqués de façon ordonnée (Figure 18). On parle de patron locomoteur. Le déclenchement de l'activité locomotrice est

assuré par des centres supraspinaux. Une fois celle-ci déclenchée, l'entretien de la locomotion et son adaptation sont assurés par un réseau de neurones spinaux spécialisés, le générateur central de rythme (« *central pattern generator* », CPG). Ces neurones sont chargés de créer automatiquement et de transmettre aux motoneurones la commande nerveuse locomotrice.

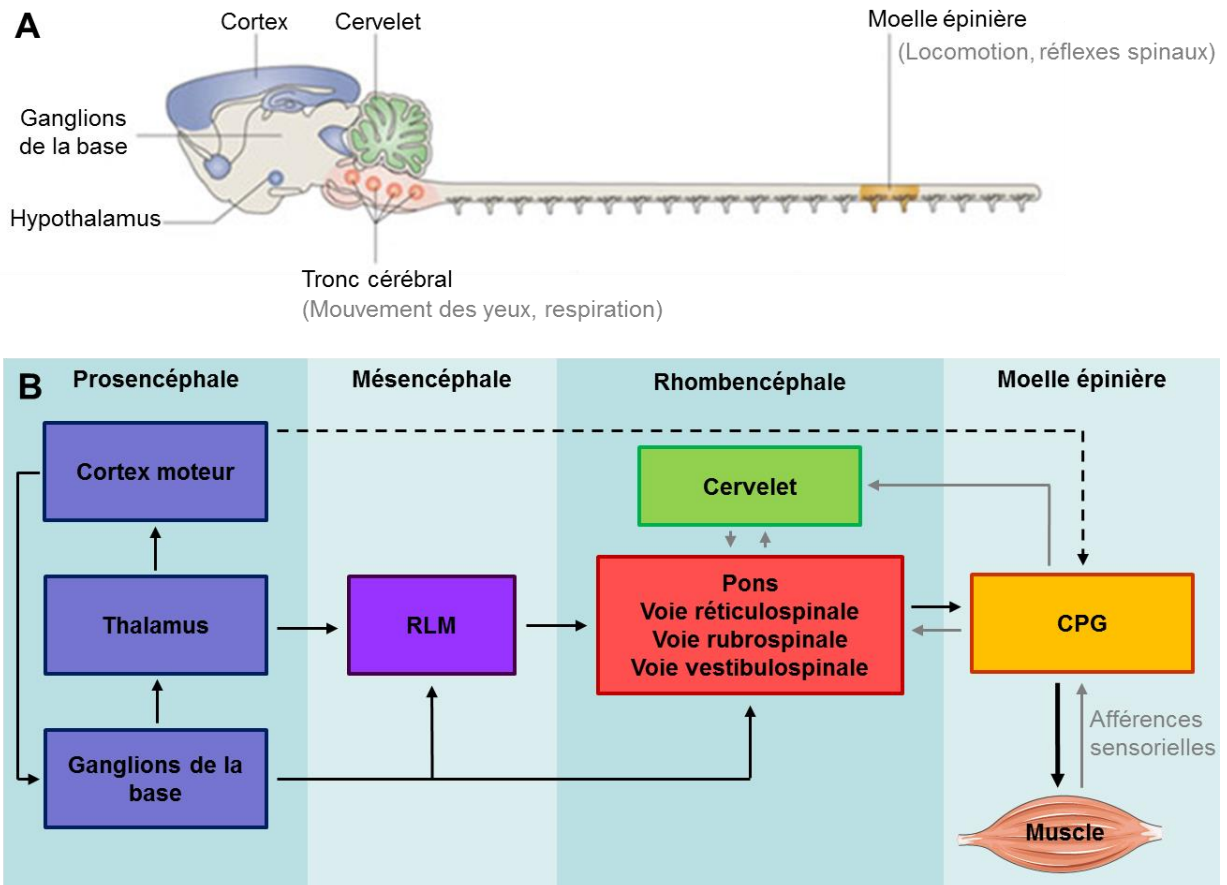


Figure 18 : Organisation du système locomoteur. A. Schéma des différentes structures du système nerveux central impliquées dans le contrôle de la locomotion. B. Schéma de contrôle de la locomotion. Les commandes musculaires sont organisées par le générateur central de rythme (CPG). La moelle épinière est elle-même modulée par des afférences d'origine périphérique et supraspinale. Les flèches noires indiquent une action directe, les flèches grises correspondent à des boucles rétroactives.

Une exposition à des conditions de microgravité induit une réorganisation globale du système sensorimoteur qui a pour conséquence une altération de la locomotion des sujets. Chez l'homme, une étude réalisée sur 23 spationautes a révélé une altération de la

coordination entre la tête, le tronc et les jambes lors d'une marche sur tapis roulant après un vol spatial de courte durée (8 à 18 jours). De plus, l'analyse cinématique montre une forte altération du patron locomoteur (Bloomberg et Mulavara 2003). Plus récemment, des études ont évalué l'impact d'un séjour de 6 mois en microgravité (Mulavara et al. 2010) ou de 60 à 90 jours d'alitement prolongé (Reschke et al. 2009) sur la locomotion, par l'utilisation d'un test de motricité fonctionnelle (*Functional mobility test ; FMT*) basé sur la réalisation d'un parcours d'obstacle. Les études montrent que les scores sont altérés après l'HH.

Chez le rat, une période d'HH de 14 jours affecte aussi profondément le patron locomoteur de l'animal (Figure 18). Ce déficit locomoteur est caractérisé par une flexion importante de la cheville lors de l'appui, une plus faible protraction (extension vers l'avant lors de la phase de transfert) et une augmentation de l'extension des membres postérieurs en fin d'appui (Canu et al. 2005). Cette dernière observation est attribuée à un retard dans le déclenchement de la phase de transfert. Cette altération du patron locomoteur est observée en condition de marche sur une piste horizontale (Canu et Garnier 2009) comme sur tapis roulant (Canu et al. 2005). L'étude de l'activité électromyographique montre que l'HH entraîne une coactivation des muscles tibial antérieur et soléaire (Canu et Falempin 1997), deux muscles antagonistes permettant respectivement la flexion et l'extension de la cheville, et une coactivation des muscles soléaires des pattes droite et gauche lors de la marche (Canu et Falempin 1998). Ces altérations du profil d'activité électromyographique peuvent participer à la baisse de précision et au manque de coordination retrouvé chez les rats HH. L'hyperflexion retrouvée lors de la phase d'appui peut être attribuée à une altération du système musculaire. En effet, elle pourrait s'expliquer par la perte de force des muscles extenseurs, qui portent le poids du corps. Toutefois, l'administration de clenbuterol, un agoniste β_2 -adrénergique connu pour induire une hypertrophie du muscle et augmenter la force musculaire, permet de limiter les effets de l'HH sur le muscle (Ricart-Firinga et al. 2000) mais n'a aucun effet sur l'altération de la performance locomotrice (Canu et al. 2001b).

Ces études suggèrent que les effets de l'HH sur la locomotion ne seraient pas uniquement musculaires. Une suractivité des motoneurones α des muscles fléchisseurs et/ou une sous-activité des motoneurones innervant les muscles extenseurs de la cheville

pourraient également rendre compte de cette hyperflexion (Canu et Garnier 2009). Cette hypothèse est appuyée par les études de Cormery et collaborateurs (2005) qui ont montré que les motoneurones innervant les muscles extenseurs de la cheville étaient moins excitables après deux semaines d'HH chez le rat. Toutefois, d'autres résultats tendent à prouver qu'une période d'HH induirait une augmentation de l'excitabilité des motoneurones α innervant les muscles extenseurs de la cheville (Anderson et al. 1999 ; De-Doncker et al. 2006). Ces résultats visiblement contradictoires peuvent s'expliquer par des différences observées sur le réflexe H entre un animal au repos ou lors de la marche. En effet, le contrôle réflexe est différent pendant une phase posturale et une phase locomotrice (Büschges et El Manira 1998 ; McCrea 2001). Cette différence est le résultat d'une désinhibition des interneurones excitateurs lors de la locomotion (Angel et al., 1996). En condition d'HH, la moindre activation des motoneurones α innervant les muscles extenseurs pourrait être due à une altération de ce processus de désinhibition.

L'étude cinématique de la locomotion du rat montre que les altérations observées après l'HH sont exacerbées sur une échelle horizontale (Canu et Garnier 2009). La locomotion sur échelle horizontale est une situation nécessitant des mouvements précis, volontaires et impliquant donc les structures supraspinales (Beloozerova et Sirota 1993; Beloozerova et al. 2003). Cette observation suggère que les effets de l'HH sur la motricité seraient liés à des effets cérébraux. Cette hypothèse est confortée par le fait que la locomotion sur tapis roulant est beaucoup moins stéréotypée chez les rats soumis à l'HH (Canu et al. 2005), ce qui suggère que certains aspects du patron locomoteur sont organisés au niveau supraspinal plutôt que dans la moelle épinière. La contribution des informations proprioceptives provenant des membres postérieurs à la régulation du patron locomoteur est moindre après une période d'hypoactivité chez le rat (Canu et al. 2001a) comme d'ailleurs chez l'homme après un vol spatial (Roll et al. 1998). Ainsi, après une période d'HH, la locomotion serait bien moins automatique et davantage volontaire, mettant ainsi en jeu le cortex moteur.

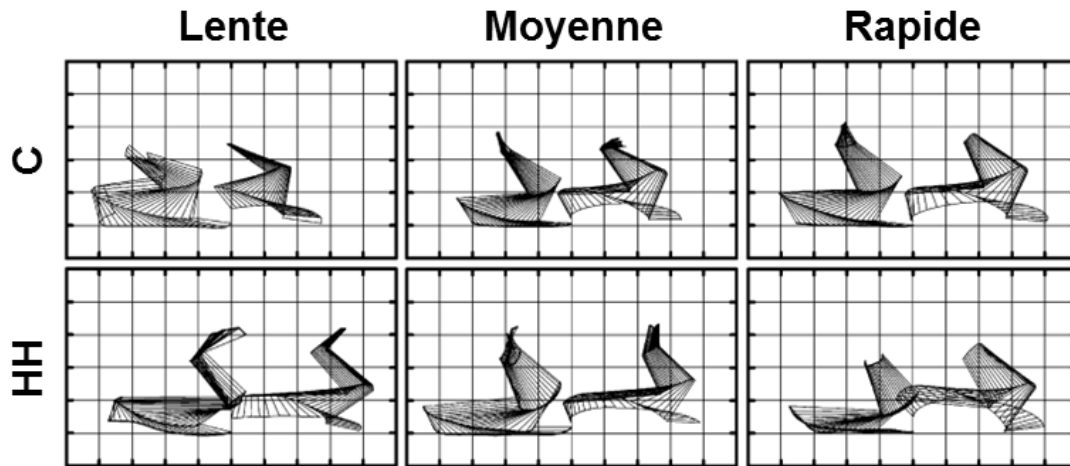


Figure 19 : Effets de l'HH sur le mouvement de la patte postérieure d'un rat. Reconstruction du mouvement de la patte postérieure droite d'un rat contrôle (C) ou soumis à l'HH dans le plan latéral durant l'appui (gauche) et le transfert (droite) à vitesse lente, moyenne ou rapide.

6. Cortex cérébral et HH

La motricité volontaire est une fonction nécessitant la mise en place de processus complexes. Elle fait autant appel à des structures motrices, directement impliquées dans la réalisation du mouvement, que sensorielles. Ces dernières sont impliquées dans l'identification de la cible ainsi que dans le contrôle du mouvement par des retours sensoriels permettant des ajustements ou des réponses appropriées.

Les altérations de la performance motrice retrouvée après une période d'HH résultent d'une combinaison de facteurs musculaires mais aussi nerveux et plus particulièrement de facteurs d'origine supraspinale (Clark et al. 2006). En effet, Kawakami et collaborateurs (2001) ont indiqué qu'après 20 jours d'alitement prolongé, environ 55 % de la variation de force s'expliquait par une altération de la commande centrale. De plus, lors d'une immobilisation d'un membre supérieur, le simple fait d'imaginer faire un mouvement de ce membre sans activer le muscle permet de limiter la perte de force observée (Clark et al. 2014), ce qui montre bien que des mécanismes nerveux, probablement au niveau supraspinal, participent à la détérioration de la performance motrice.

a. Cortex moteur primaire

Le développement des techniques de stimulation magnétique transcrânienne a permis l'étude du cortex moteur chez l'humain. Les études sur les effets d'une situation

d'HH sur le cortex moteur primaire chez l'homme sont rares et les résultats souvent contradictoires ou dépendant du type, de la durée ou du membre soumis à l'HH. En effet, selon les études, **la surface de représentation du membre immobilisé** augmente après 3 à 6 semaines (Zanette et al. 2004), diminue après 6 à 60 semaines (Liepert et al. 1995), ou est inchangée après 35 semaines (Milliken et al. 2013). Dans cette dernière étude toutefois, les auteurs ont décrit une réorganisation à l'intérieur de cette zone. En ce qui concerne **l'excitabilité corticale**, un plâtre de 10 jours d'un membre inférieur augmente l'excitabilité corticale au niveau de la zone de représentation du membre (Roberts et al 2007), alors qu'elle diminue après 6 à 60 semaines (Liepert et al. 1995). De la même façon, l'immobilisation d'un membre supérieur de 3 à 6 semaines induit soit une diminution (Kaneko et al. 2003) soit une augmentation (Zanette et al. 2004) de l'excitabilité corticale. Enfin, une immobilisation de 4 à 7 jours des doigts entraîne soit une baisse d'excitabilité (Facchini et al. 2002) soit n'a pas d'effet significatif (Lundbye-Jensen et Nielsen 2008).

Chez le rat, des études électrophysiologiques récentes ont montré qu'une immobilisation de la patte antérieure (Viaro et al. 2014) ou une élévation du train postérieur (Langlet et al. 2012) diminue fortement la taille de représentation du membre affecté (-40 % et -61 % respectivement). De plus, l'étude par microstimulations intracorticales de longue durée a montré l'effet d'une immobilisation sur la réalisation de mouvements complexes. Une période de plâtre de 30 jours de la patte antérieure altère la trajectoire et diminue la vitesse des mouvements d'abduction, d'adduction ou de protraction (Budri et al. 2014). Cette réorganisation corticale est accompagnée d'une augmentation du seuil de stimulation nécessaire pour induire un mouvement. Ainsi, l'HH induit une réorganisation de la carte somatotopique et diminue l'excitabilité corticale du cortex moteur primaire. Ce changement d'excitabilité est lié à une altération des propriétés intrinsèques des neurones. En effet, une diminution de la résistance d'entrée des neurones pyramidaux et une augmentation de la rhéobase sont observées après une période d'HH de 14 jours (Canu et al. 2010). Cette réorganisation du cortex moteur est aussi accompagnée de modifications morphologiques. En effet, l'HH augmente le nombre d'épines dendritiques des neurones pyramidaux, spécifiquement dans la zone de représentation de la patte postérieure (Trinel et al. 2013).

b. Cortex somesthésique primaire

Chez l'homme, l'immobilisation de la main pendant 72 h (Weibull et al. 2011) ou 14 jours (Langer et al. 2012), ou encore de l'index pendant 2 semaines (Lissek et al. 2009) induisent une diminution de l'activité corticale dans les zones de représentations, ainsi qu'une réduction de la discrimination tactile.

Plusieurs études réalisées chez le rat ont également décrit une réorganisation dépendante de l'activité en réponse à l'HH (Coq et Xerri 1999 ; Langlet et al. 1999 ; Dupont et al. 2003, 2011) ou sur des rats placés dans un environnement appauvri (Coq & Xerri, 1999 ; 2001), une situation proche de l'HH dans la mesure où les deux situations se caractérisent par une diminution des activités sociales (interactions sociales, toilettage). Une diminution de la zone de représentation de la patte est observée, ainsi qu'un élargissement des champs récepteurs cutanés. Après 14 jours d'HH, une augmentation de l'expression de la protéine Fos (couramment utilisée en tant que marqueur d'activité neuronale) est observée dans la couche IV du cortex sensorimoteur, au niveau de la zone de représentation de la patte postérieure (Langlet et al. 2001). Cette observation indique qu'il existe une activation accrue des neurones corticaux. Cette observation est confortée par le fait que le seuil d'excitabilité des neurones corticaux est diminué et la réponse à une stimulation périphérique accrue, sans toutefois que l'activité spontanée de ces neurones ne varie (Dupont et al. 2003). Ces changements sont transitoires et réversibles. En effet, bien qu'une période de 14 jours soit nécessaire pour induire une diminution significative de la taille de représentation de la patte postérieure, la récupération est complète dans un temps bien plus court (6h ; Dupont et al. 2001). Toutefois, cette rapidité de récupération semble liée à la zone étudiée. En effet, Coq et Xerri (1999) ont montré qu'une période de récupération supérieure à une semaine était nécessaire suite à une immobilisation de 7 jours de la patte antérieure.

c. Mécanismes impliqués dans la plasticité corticale

Les changements plastiques exposés ci-dessus sont probablement dus à une combinaison de plusieurs facteurs.

Neurotransmetteurs. L'HH diminue les taux de **GABA** (Canu et al. 2006) et le nombre de cellules immunoréactives au GABA (D'Amelio et al. 1996) dans le cortex somesthésique

primaire, sans influencer les taux de neurotransmetteurs excitateurs comme le glutamate ou l'aspartate (Canu et al. 2006). Ainsi, les réorganisations corticales retrouvées après une période d'HH seraient dues à une levée d'inhibition plutôt qu'à une augmentation de l'excitation. La réorganisation du cortex somesthésique induite par l'HH est dépendante de **mécanismes cholinergiques** ; l'application d'un antagoniste des récepteurs muscariniques pendant l'HH empêche la réorganisation corticale (Dupont et al. 2002).

Neurotrophines. L'HH induit également une augmentation des taux d'ARNm du **NGF** et du **BDNF**. Cet effet est associé à une augmentation du taux de NGF dans le cortex sensorimoteur (Dupont et al. 2005).

Voies de signalisation intracellulaire. Une augmentation de l'activation de la voie de signalisation des MAPK est observée après l'HH. L'activation de cette voie est, de plus, nécessaire à la réorganisation corticale induite par l'HH. En effet, l'inhibition de la protéine **ERK** prévient la réduction de la taille de représentation de la patte postérieure et entraîne même une augmentation de cette zone (Dupont et al. 2011).

Expression génique. Keyvani et collaborateurs (2002) a montré qu'une période d'HH induit des changements d'expression génique spécifiquement dans le cortex sensorimoteur de la patte immobilisée. Ainsi, l'HH induit une diminution de l'expression de certains gènes impliqués dans la signalisation neuronale (protéine G, Akt1), la matrice extracellulaire (lipophiline) ou les mécanismes énergétiques (*cytochrome C oxydase*), ou encore des facteurs de transcription (*DNA-binding protein inhibitor ID-2, ID-3*).

La réorganisation des cartes et l'élargissement des champs récepteurs cutanés sont sous-tendus par des mécanismes différents. En effet, suite à des changements d'activité sensorimotrice, des évolutions différentes ont été constatées entre la réduction de la taille de représentation de la patte postérieure et l'élargissement des champs récepteurs. La taille de représentation de la patte postérieure diminue progressivement pendant 14 jours puis revient à des valeurs contrôle à 28 jours d'HH alors que l'élargissement des champs récepteurs va s'accroître tout au long des 28 jours d'HH (Dupont et al. 2011). En outre, l'utilisation d'un antagoniste de la voie des MAPK prévient la réduction de la représentation de la patte postérieure sans affecter les champs récepteurs (Dupont et al. 2011).

C. Effets de l'HH sur l'IGF-1

Une période d'inactivité induit donc une sévère altération des systèmes musculaire et nerveux, ce qui induit une dégradation de la performance motrice. Au vu des effets de l'IGF-1 sur le système nerveux et de son implication dans les effets bénéfiques de l'exercice physique au niveau cérébral, il semble légitime de s'intéresser aux effets de l'HH sur l'IGF-1. Toutefois, ces effets sont mal connus.

Chez l'homme, un alitement prolongé de 14 jours n'induit pas de variation du taux plasmatique d'IGF-1 (Ferrando et al. 1996). En revanche, ce taux est augmenté durant un séjour en microgravité (5 jours), et revient à l'état basal quelques jours après le retour sur Terre (Strollo et al. 1998). Chez la souris, 8 jours d'HH par élévation du train postérieur induisent une diminution de la production d'IGF-1 dans le muscle et une augmentation des taux d'expression d'IGFBP-5 (Awede et al. 1999). Chez le rat, Perrien et collaborateurs (2007) ont montré qu'une période d'HH entraîne une diminution du taux d'IGF-1 chez l'adulte. De plus, une immobilisation des pattes postérieures par plâtrage induisent également une diminution des taux d'IGF-1 dans les muscles soléaire et tibial antérieur, mais après seulement 4 et 8 semaines respectivement (Suliman et al. 2001). Aucun changement n'est observé après 5 jours. En ce qui concerne la GH, hormone régulant la production d'IGF-1, l'HH réduit les taux de GH plasmatiques disponibles (Bigbee et al. 2006).

Au niveau du système nerveux, les seules informations disponibles concernent la moelle épinière. Après 5, 14 ou 28 jours d'immobilisation, une diminution des taux d'IGF-1 est observée dans la région lombaire. De plus, à 14 et 28 jours d'immobilisation, une augmentation de la densité des IGF-1R est observée dans cette même région (Suliman et al. 2001). Toutefois, au niveau cérébral, les effets de l'HH sont actuellement inconnus. Compte tenu des données de la littérature sur les effets de l'HH sur l'IGF-1 circulant et spinal, il est probable que les taux d'IGF-1 soient également affectés dans les structures supraspinales. C'est la question à laquelle nous avons tenté de répondre dans notre première étude.

PARTIE 2

TRAVAUX EXPERIMENTAUX

I. Etude des effets de l'HH sur la voie de signalisation de l'IGF-1 dans différentes structures impliquées dans la performance motrice

A. Introduction

Comme nous l'avons décrit dans le chapitre précédent, une période d'HH induit une sévère altération de la performance motrice dont l'origine est à rechercher à la fois aux niveaux musculaire et nerveux, et plus particulièrement dans les structures supraspinales (Clark et al. 2006). Afin d'améliorer nos connaissances sur les mécanismes à l'origine de la réorganisation du cortex sensorimoteur en situation d'hypoactivité, je me suis intéressé à l'IGF-1. Cet intérêt a été motivé par trois raisons : d'une part, les effets de l'IGF-1 sur le cerveau sont bien décrits : modulation de la plasticité synaptique et de l'excitabilité neuronale, croissance dendritique, angiogenèse... (Fernandez and Torres-Alemán 2012) ; d'autre part, de nombreux travaux font de l'IGF-1 une molécule-clé pour rendre compte des effets bénéfiques de l'exercice physique au niveau cérébral (Llorens-Martín et al. 2008). L'exercice permet ainsi de limiter l'évolution de maladies neurodégénératives, l'impact d'une ischémie ou l'apparition de comportements dépressifs... Enfin, l'entrée d'IGF-1 au niveau cérébral se fait spécifiquement dans les zones cérébrales actives (cf partie1 II.C.a) et l'activité du cortex sensorimoteur est réduite en condition d'HH.

Ainsi, il semblait légitime de se demander si la réorganisation cérébrale induite par l'HH ne serait pas tout ou partie due à une altération du système IGF-1. Le premier objectif de mon travail de thèse a donc été de **déterminer quels étaient les effets de l'HH sur le niveau d'IGF-1 circulant**. Pour cela, les taux d'IGF-1 plasmatiques ont été quantifiés. De plus, les taux d'IGFBP-3 et IGFBP-5, protéines de liaison capables de se fixer à l'IGF-1 majoritaire dans le sang, ont été évalués.

Le second objectif de cette étude a été d'**évaluer les effets de l'HH sur le système IGF-1 au niveau cérébral**. Pour répondre à cet objectif, les taux d'IGF-1, l'expression et l'activation de son récepteur et de la voie de signalisation PI3K/AKT ont été étudiés dans plusieurs structures cérébrales impliquées dans la motricité (cortex moteur, striatum, cervelet).

B. Matériel et méthodes

1. Animaux et traitements

Cette étude a été réalisée sur 38 rats adultes (280 g - 320 g) de souche Wistar divisés aléatoirement en deux groupes :

- C : rats contrôles (n=20)
- HU14¹ : rats soumis à 14 jours d'HH (n=18)

Les dosages d'IGF-1 cérébraux et l'analyse de la voie de signalisation PI3K-AKT ont nécessité des conditions expérimentales différentes. Ainsi, 7 rats de chaque groupe ont été utilisés pour le dosage des taux d'IGF-1 cérébraux. Les autres rats (C : n=13 ; HU14 : n=11) ont permis d'étudier les effets de l'HH sur l'expression et la phosphorylation du récepteur à l'IGF-1 et de la voie de signalisation PI3K-AKT. La quantification de l'IGF-1 plasmatique et l'analyse des IGF-BPs a été réalisée sur des échantillons de sang prélevés avant perfusion intracardiaque.

De plus, 10 rats supplémentaires ont été utilisés afin d'étudier l'évolution du taux de corticostérone au cours de l'HH. Ces rats ont été divisés aléatoirement en deux groupes (HU3 et HU7 : rats soumis à 3 et 7 jours d'HH respectivement, n=5). Enfin, 4 rats C ont été utilisés afin de mettre en évidence les récepteurs à l'IGF-1 au niveau du cortex cérébral par immunohistochimie.

2. Expérimentations

Les études ont été réalisées sur des échantillons de sang circulant, ou sur diverses aires cérébrales impliquées dans la motricité (zone de représentation de la patte postérieure au niveau du cortex sensorimoteur ; cervelet ; striatum). En outre, l'étude a été réalisée sur un échantillon de cortex visuel (témoin interne). Nous avons déterminé :

- les taux d'IGF-1 plasmatiques et cérébraux par ELISA ;

¹ Nous reprenons ici le nom des groupes tel qu'il est utilisé dans les articles. HU correspond à l'abréviation de « *hindlimb unloading* ».

- les taux plasmatiques des IGFBP-3 et IGFBP-5 et leurs quantités relatives liées à l'IGF-1 par western blot ;
- l'expression et la phosphorylation du récepteur à l'IGF-1, d'AKT, de GSK3 β et de p70S6K dans ces mêmes structures cérébrales par western blot ;
- les taux plasmatiques de corticostérone par ELISA ;
- la présence de cellules immunoréactives au récepteur à l'IGF-1 (IGF-1R) dans les différentes couches corticales du cortex sensorimoteur par immunohistochimie.

C. Principaux résultats

- Au niveau plasmatique, l'HH diminue légèrement les taux d'IGF-1 (-9 % ; $p=0.06$). En revanche, elle n'affecte pas les taux d'IGFBP-3 ou IGFBP-5 ou leurs quantités relatives liées à l'IGF-1. Toutefois, nos résultats montrent une grande variabilité interindividuelle.
- Au niveau cérébral, l'HH induit une forte diminution des taux d'IGF-1 (-28 % ; $p<0.001$) spécifiquement dans le cortex sensorimoteur.
- En condition contrôle, les taux d'IGF-1R sont plus élevés dans les couches corticales II/III et V/VI que dans la couche granulaire (Figure 20). L'HH ne modifie pas les taux d'IGF-1R dans le cortex sensorimoteur, mais son activation est diminuée. Ce dernier point s'accompagne d'une diminution de l'activation d'AKT ainsi que de p70S6K. Ces changements sont importants dans le cortex sensorimoteur (entre -82 % et -37 %), et plus modérés dans le striatum (-60 %). En revanche, aucun effet n'est décelé au niveau du cervelet.
- Un léger effet de l'HH est observé au niveau du cortex visuel [baisse d'activation de l'IGF-1R (-30 % ; $p<0.05$) et d'AKT (-54 % ; $p<0.05$)], ce qui suggère que l'HH a un effet global sur le cortex.
- Le taux sanguin de corticostérone est augmenté après 3 jours d'HH mais revient à des valeurs normales après 7 jours (Figure 21), ce qui suggère que la diminution d'IGF-1 plasmatique ne peut pas être attribuée à une réponse au stress.

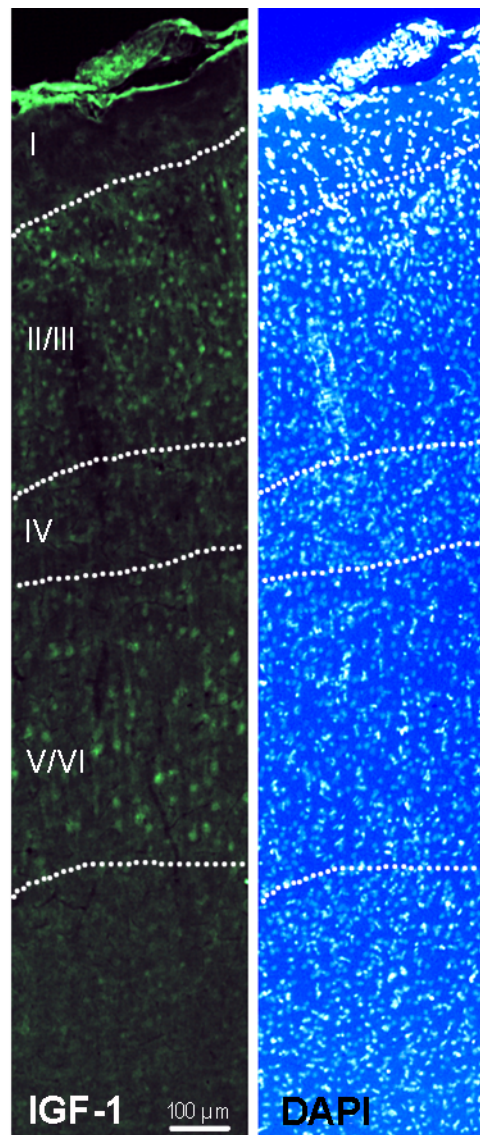


Figure 20 : Présence de cellules immunoréactives à l'IGF-1 dans le cortex sensorimoteur. Les cellules immunoréactives pour l'IGF-1 sont principalement localisées dans les couches II/III et V/VI, et plus rarement dans la couche granulaire (IV).

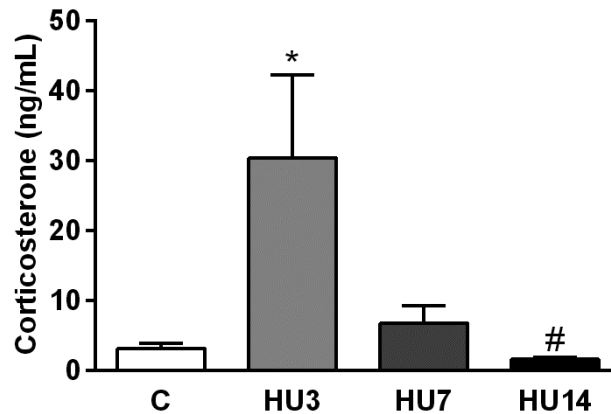


Figure 21 : Evolution des taux plasmatiques de corticostérone au cours de l'HH. Les histogrammes représentent les taux de corticostérone chez des rats contrôles (C) ou soumis à 3 (HU3), 7 (HU7) ou 14 (HU14) jours d'HH. Les résultats sont présentés sous la forme de moyenne \pm SEM. * et # indiquent une différence significative ($p < 0.05$) par rapport aux valeurs contrôles et HU3 respectivement.

D. Résultats complémentaires

Nous avons souhaité déterminer quelle était l'étendue de diffusion de l'IGF-1 lorsqu'il était administré au moyen d'une mini-pompe osmotique. Pour cela, une pompe emplie de bleu trypan dissout dans du LCR artificiel (1/1000) a été implantée chez un rat contrôle. La canule était placée aux coordonnées A-3,5, L3 par rapport au bregma, soit légèrement en arrière de la zone d'intérêt (A-1, L3). Après 14 jours de diffusion, le rat a été perfusé par une solution de paraformaldéhyde 4% et des coupes de cerveau (épaisseur : 150 μ m) ont été réalisées. La coloration bleue a été retrouvée bilatéralement, sur une surface totale d'environ 20 mm². Du côté ipsilatéral à l'implantation, le colorant a diffusé de A+2 à A-7, et latéralement de L0 à L6 ; du côté controlatéral, la coloration a été retrouvée de A0 à A-4, et de L0 à L2. Cette zone recouvrait intégralement le cortex sensorimoteur du côté ipsilatéral. De plus, la coloration est observée sur 3 mm de profondeur, indiquant une diffusion efficace dans toutes les couches du cortex. Une forte concentration de colorant est observée au dessus du corps calleux et, à l'inverse, est peu retrouvé sous le corps calleux, notamment au niveau du thalamus ou du striatum.

E. Conclusion

Cette étude a permis de mettre en évidence un effet de l'HH sur le système IGF-1, et plus particulièrement au niveau du cortex sensorimoteur. En prenant en considération le rôle central attribué à l'IGF-1 au niveau cérébral (Torres-Aleman 2010) et son implication dans les effets bénéfiques d'une augmentation de l'activité physique (Llorens-Martín et al. 2010), il est possible que les effets corticaux retrouvés après une période d'HH soient, au moins partiellement, dus à cette baisse de l'IGF-1 retrouvée au sein du cortex sensorimoteur.

F. Article

Hypoactivity Affects IGF-1 Level and PI3K/AKT Signaling Pathway in Cerebral Structures Implied in Motor Control

J. Mysoet, M.H. Canu, C. Cieniewski-Bernard, B. Bastide, E Dupont

PLoS One. (2014) 9(9):e107631. doi: 10.1371/journal.pone.0107631.

Conception de l'étude, élaboration du protocole : **JM** ED MHC

Réalisation des expériences : **JM** ED CCB

Analyse des données : **JM** ED MHC

Écriture de l'article : **JM** ED MHC BB CCB

II. Etude des effets d'une administration corticale d'IGF-1 sur la plasticité corticale, et conséquences comportementales

A. Introduction

Nos premiers travaux ont montré que le l'HH entraîne une diminution sensible des taux d'IGF-1 et de la voie de signalisation associée PI3K-AKT dans le cortex sensorimoteur. Toutefois, aucune étude n'a démontré une relation directe entre l'IGF1 et les changements plastiques cérébraux induits par l'HH (Langlet et al. 1999, 2012 ; Dupont et al. 2003). Pourtant, l'IGF-1 est connu pour augmenter l'excitabilité neuronale par son action sur les canaux ioniques (calciques, potassiques) (Blair and Marshall 1997; Nuñez et al. 2003), et pour faciliter la transmission synaptique en limitant la composante inhibitrice (GABA) (Maya-Vetencourt et al. 2012). De plus, l'IGF-1 apparaît comme le médiateur des effets bénéfiques de l'activité physique au niveau cérébral (Llorens-Martín et al. 2010). Aussi, nous pouvons nous demander si, dans notre modèle d'hypoactivité, la baisse d'IGF-1 serait également le médiateur des effets de l'HH sur le cortex. Autrement dit, **la baisse d'IGF-1 observée après un épisode d'HH, participe-t-elle aux changements d'organisation et d'excitabilité corticale ?** Pour répondre à cette question, nous avons évalué si, en maintenant les taux d'IGF-1 dans le cortex sensorimoteur, les changements corticaux induits par l'HH peuvent être prévenus.

Le cortex sensorimoteur est directement impliqué dans la performance motrice. En effet, une lésion du cortex sensorimoteur chez l'homme entraîne systématiquement des déficits somesthésiques et/ou une sévère apraxie en fonction de l'étendue de la zone lésée (Caselli 1993). A l'inverse, l'apprentissage de tâches complexes augmente l'activité du cortex sensorimoteur (Karni et al. 1995). Dans des situations d'HH, des résultats comparables ont été retrouvés chez l'homme puisque l'immobilisation de la main entraîne une diminution de la performance motrice (mouvements moins précis, moins rapides) (Huber et al. 2006) associée à une baisse d'activité du cortex moteur. D'un point de vue sensoriel, une faible activation du cortex somesthésique est accompagnée d'une faible discrimination tactile (Lissek et al. 2009). De plus, chez l'homme (Tegenthoff et al. 2005) comme chez l'animal

(Martinez et al. 2009), la discrimination tactile, *i.e.* le seuil de sensibilité de l'index ou le score calculé à partir de test de l'adhésif, est directement corrélé à la taille de représentation du membre concerné. Par conséquent, si notre première hypothèse est vérifiée, *i.e.* si l'IGF-1 prévient les altérations corticales, cette prévention peut-elle limiter l'altération de la performance motrice induite par l'HH ?

B. Animaux et traitements

Ces études ont été réalisées sur des rats mâles adultes (280 g - 320 g) de souche Wistar divisés aléatoirement en 4 groupes :

- C : rats contrôles ;
- HU : rats soumis à 14 jours d'HH ;
- IGF-1 : rats munis d'une pompe osmotique délivrant de l'IGF-1 (50 µg/mL) à une vitesse de 0,48 µL/h pendant 14 jours ;
- HU-IGF-1 : rats munis d'une pompe osmotique délivrant de l'IGF-1 et soumis à 14 jours d'HH ;

L'IGF-1 a été administré au moyen d'une pompe osmotique (modèle 2002, Alzet) associée à une canule positionnée sur le crâne légèrement en arrière de la zone de représentation de la patte postérieure (coordonnées : antérieur -3,5 mm, latéral 3 mm par rapport au bregma).

Les expériences (études électrophysiologiques et comportementales) ont été réalisées sur trois lots de rats différents. En effet, la réalisation de tests comportementaux nécessite une brève anesthésie pour retirer le dispositif de suspension, et une période de récupération de quelques heures après l'HH. En revanche, l'étude du cortex somesthésique doit être réalisée très rapidement car les caractéristiques du cortex somesthésique reviennent à la normale en quelques heures seulement (6 h) après un retour en situation « terrestre » (Dupont et al. 2001). Enfin, l'étude du cortex moteur demande une anesthésie différente de celle utilisée lors des autres expérimentations. Ainsi, l'analyse électrophysiologique du cortex somesthésique a été réalisée sur 33 rats (9 C, 12 HU, 5 IGF-1, 7 HU-IGF-1), l'analyse du cortex moteur sur 39 rats (13 C; 14 HH; 5 IGF-1; 7 HU-IGF-1) et l'analyse comportementale sur 29 autres rats (7 C, 7 HU, 7 IGF-1, 8 HU-IGF-1).

C. Etude des effets de l'IGF-1 sur le cortex somesthésique et la sensibilité tactile

Dans un premier temps, nous avons **déterminé les effets d'une administration chronique d'IGF-1 pendant la période d'HH sur la réorganisation du cortex somesthésique**. Pour cela, l'aire de la représentation corticale de la patte postérieure, les champs récepteurs cutanés et les seuils d'excitabilité corticaux ont été évalués chez des rats soumis ou non à l'HH et/ou ayant reçu ou non de l'IGF-1.

Dans un second temps, **l'effet de l'IGF-1 sur la dégradation de la performance sensorielle a été étudié**. Pour répondre à cet objectif, la sensibilité tactile des rats a été déterminée par l'utilisation de tests comportementaux (test de retrait de la patte, test de l'adhésif).

1. Expérimentations

L'étude électrophysiologique consiste, pour chaque rat, à déterminer l'aire de représentation corticale du pied. Pour cela, une électrode d'enregistrement est insérée dans le cortex et une pression mécanique légère (< 400 mg) est effectuée au niveau du pied au moyen de filaments de Semmes-Weinstein. Les paramètres suivants sont recueillis :

- Le champ récepteur cutané est la zone cutanée dont la stimulation induit une décharge neuronale ;
- le seuil correspond à la plus faible pression entraînant une activation corticale ;
- l'aire corticale de représentation du pied, qui rassemble l'ensemble des points répondant à la stimulation du pied.

La sensibilité tactile a été évaluée par 2 tests. Le premier est le test de retrait de la patte. Dans une cage dont le sol est percé de trous (diamètre : 10 mm, écart : 15 mm), des stimulations mécaniques sont appliquées, de façon aléatoire, sur la surface plantaire des pattes antérieures (2 g) et postérieures (8 g) de l'animal avec des filaments de Semmes-Weinstein. Vingt essais sont réalisés pour chacune des pattes. Le nombre de fois où le rat retire sa patte est comptabilisé. Chaque rat réalise l'expérience deux fois. La première avant

(T0), en situation contrôle, la seconde après implantation (T14) de la pompe et/ou HH. Les résultats sont exprimés selon la différence entre T14 et T0. Le second test est le test de l'adhésif qui sera présenté dans les résultats complémentaires (Cf II.E.2)

2. Principaux résultats

- L'HH induit un rétrécissement de l'aire corticale de représentation du pied (-21 %, $p < 0.05$). L'administration d'IGF-1 chez un rat « terrestre » n'affecte pas la taille de la carte. Toutefois, en condition d'HH, l'IGF-1 prévient le rétrécissement et entraîne même une augmentation de la surface de représentation du pied (+38 %, $p < 0.001$).
- L'HH (+68 %, $p < 0.001$) comme l'IGF-1 (+30 %, $p < 0.05$) entraînent un élargissement des champs récepteurs cutanés. Toutefois, les champs récepteurs des rats IGF-1 ou HH-IGF-1 sont moins étendus que ceux des rats soumis à l'HH (-22 %, $p < 0.01$), et ont donc une taille intermédiaire entre C et HH.
- Après une période d'HH, les neurones des rats répondent à des stimulations périphériques plus faibles (50 % des neurones répondent à des stimulations mécaniques de 8 mg). L'IGF-1 induit, lui aussi, une forte diminution de ces seuils d'excitabilité, que ce soit en condition terrestre ou HH.
- L'évaluation de la sensibilité tactile a montré que le nombre de retraits des pattes postérieures était diminué après l'HH (-13 %, $p < 0.01$). Bien que l'IGF-1 en condition « terrestre » n'ait pas d'effet, lorsqu'il est administré en condition d'HH, l'IGF-1 prévient cette diminution du nombre de retraits de patte.

D. Etude des effets de l'IGF-1 sur le cortex moteur et la performance motrice

Dans cette étude, les effets d'une administration d'IGF-1, pendant toute la période de l'HH, sur la réorganisation du cortex moteur ont été déterminés. Dans ce but, l'aire de représentation corticale des articulations de la patte postérieure et les seuils d'excitabilité corticaux ont été évalués sur nos 4 groupes d'animaux. En outre, l'effet de l'IGF-1 sur la dégradation de la performance motrice a été étudié. Nous avons évalué l'activité spontanée du rat en réponse à la nouveauté et pendant sa phase active par actimétrie, et la motricité fine par le test de l'échelle horizontale.

1. Expérimentations

L'étude électrophysiologique consiste, pour chaque rat, à déterminer l'aire de représentation corticale de la patte postérieure. Pour cela, une électrode de stimulation est introduite dans le cortex et une stimulation électrique ($< 80 \mu\text{A}$) est appliquée. Les paramètres suivants sont recueillis :

- Le seuil correspond à la plus faible intensité électrique induisant le mouvement d'une articulation ;
- L'aire de représentation relative à une articulation, qui rassemble les points induisant le mouvement d'une articulation (doigts, cheville, genou, hanche) ;
- L'aire de représentation totale de la patte postérieure, qui rassemble l'ensemble des points induisant le mouvement de n'importe laquelle de ces articulations.

La performance motrice a été évaluée par l'utilisation de tests liés à différents aspects de la motricité. Ces expérimentations ont été réalisées avec les mêmes animaux que pour l'évaluation de la sensibilité tactile (cf. paragraphe 1)

L'actimétrie permet d'évaluer l'activité spontanée de l'animal en réponse à la nouveauté et durant sa phase active. L'activité est mesurée grâce à un actimètre équipé de détecteurs infrarouges permettant de comptabiliser le nombre de déplacements horizontaux et verticaux du rat. La première phase commence à 18 h, *i.e.* 1 h avant la fin du cycle « jour ». Les mouvements de l'animal sont comptabilisés pendant les 30 premières

minutes ; ils correspondent à la réponse à la nouveauté. La seconde phase s'étend de 19 h à 7 h, pendant le cycle « nuit » et nous informe sur l'activité motrice spontanée du rat.

Le test de l'échelle horizontale est adapté de Metz et Whishaw (2002). Le rat est placé à une extrémité d'un couloir (longueur : 98 cm ; largeur : 12 cm) dont le sol est composé de barreaux de métal (diamètre : 4 mm) espacés de 2 cm. Une cage obscure est placée de l'autre côté afin de créer un environnement familier. Le rat réalise 3 essais. Seuls les deux les plus rapides sont analysés. Plusieurs paramètres sont évalués : le temps que le rat met pour passer d'un coté à l'autre, la longueur de l'enjambée, la coordination entre les membres et le nombre d'erreurs (intrusions d'une patte entre les barreaux).

2. Principaux résultats

- L'HH induit un rétrécissement de la surface de représentation de la patte postérieure (-50 %, $p < 0.001$). A l'inverse, l'IGF-1 entraîne une légère augmentation de cette aire corticale motrice (entre +10 et +43 %, $p = 0.058$).
- Pour les surfaces relatives à chaque articulation, un gradient proximo-distal est observé chez les rats C, *i.e.* les membres distaux sont moins représentés que les membres proximaux. L'IGF-1 accentue ce gradient, alors que l'HH le supprime. Toutefois, en condition d'HH, l'IGF-1 prévient l'altération du gradient.
- Concernant les intensités minimales pour induire un mouvement périphérique, en condition contrôle, un gradient proximo-distal est également observé, *i.e.* les articulations distales sont activées par des intensités électriques plus faibles que les articulations proximales. L'HH accentue ce gradient. L'IGF-1, en condition d'HH ou « terrestre », tends à faire disparaître ce gradient, *i.e.* chaque articulation réponds à un seuil équivalent.
- L'HH a un effet délétère sur la performance motrice. Les rats HH ont une activité très basse que cela soit en réponse à la nouveauté (-60 %, $p < 0.01$) ou pendant leur phase active (-38 % ; $p < 0.01$). En revanche, l'IGF-1 en condition « terrestre » augmente l'activité motrice spontanée des rats (entre +27 % et +37 %). En condition d'HH, l'IGF-1 prévient une partie des effets de l'HH sur l'activité motrice, en réponse à la nouveauté ou en phase active (respectivement +98 % et +43 % par rapport au groupe HH).

- L'évaluation de la motricité fine par le test de l'échelle horizontale a montré que l'HH altère profondément la performance motrice. L'administration d'IGF-1 n'a pas d'effets sur la réalisation de ce test.

E. Résultats complémentaires

1. Test de l'adhésif

Le test de l'adhésif, adapté de Bouet et collaborateurs (2009), a été réalisé immédiatement après le test de retrait de la patte. Il permet de séparer l'aspect sensoriel (latence de détection) de l'aspect plus moteur (durée d'enlèvement). Un adhésif de 5 mm² est appliqué de façon aléatoire sur la patte antérieure droite ou gauche, au niveau de la paume. Une pression équivalente est appliquée sur l'autre patte. Le rat est ensuite replacé dans la cage et le test débute. Deux expérimentateurs sont placés de part et d'autre de la cage afin de détecter, le plus précisément possible, (1) le temps que le rat met pour détecter l'adhésif, *i.e.* le temps nécessaire pour que le rat réagisse à la présence de l'adhésif (secouer la patte ou chercher à enlever l'adhésif), et (2) le temps nécessaire pour l'enlever de sa patte. Le temps de détection fait appel à la sensibilité tactile de l'animal alors que le temps nécessaire pour enlever l'adhésif correspond à une composante plus motrice. L'essai est considéré comme un échec si au moins l'une des conditions suivantes est remplie : (1) le rat n'a pas détecté l'adhésif après 60 s ; (2) le rat n'a pas ôté l'adhésif au bout de 180 s. Chaque rat réalise l'expérience deux fois. La première avant (T0), en situation contrôle, la seconde après implantation de la pompe et/ou HH (T14).

Bien que nos résultats montrent des variations intéressantes, aucune ne s'avère significative. Cette absence de significativité est due à une grande variabilité inter- et intra-individuelle. Dans chacun des groupes à T0, 1 à 2 essais ont été considérés comme des échecs. Le nombre d'échecs n'augmente pas après une période d'HH (2 échecs / 7 essais) et/ou après infusion d'IGF-1 (groupe IGF-1 : 2 échecs / 7 essais ; groupe HU-IGF-1 : 3 échecs / 8 essais).

Chez les rats C, il faut au rat 11 ± 2 s pour réagir à la présence de l'adhésif (Figure 22A). Les rats HH mettent moins de temps à le détecter (6 ± 4 s ; -43 %). L'IGF-1 seul ne semble pas influencer le temps de détection (12 ± 4 s ; +9 %). Toutefois, chez des rats

ayant été soumis à l'HH, l'IGF-1 accroît considérablement le temps de détection (28 ± 9 s ; +155 %).

La Figure 22B présente la durée que le rat met pour retirer l'adhésif après sa détection. Ces résultats nous renseignent sur une composante plus motrice du test. Ainsi, les rats C mettent en moyenne 18 ± 6 s pour retirer l'adhésif; cette durée semble augmenter (27 ± 13 s ; +50 %) pour les rats HH. L'IGF-1 diminue la durée d'enlèvement chez des rats « terrestres » ou soumis à l'HH. En effet, la latence d'enlèvement des rats IGF-1 est en moyenne de 3 ± 1 s (-83 % par rapport au groupe C) et de 13 ± 8 s chez les rats HU-IGF-1 (-52 % par rapport au groupe HU).

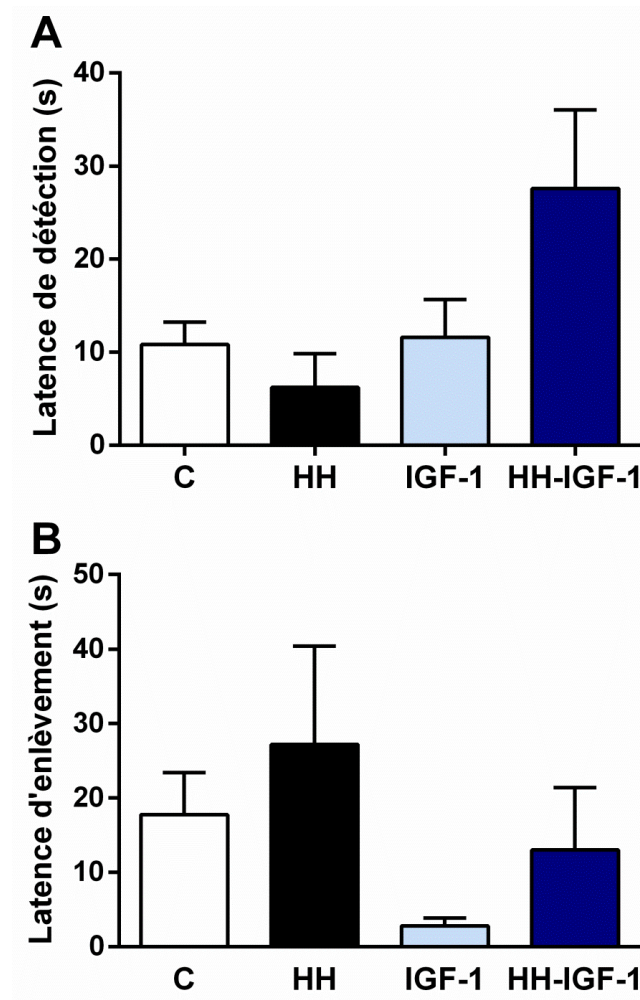


Figure 22 : Effets de l'HH et/ou de l'IGF-1 sur la réponse au test de l'adhésif. Les histogrammes représentent le temps mis par le rat pour détecter (A) ou enlever (B) l'adhésif. Les résultats sont présentés sous la forme de moyenne \pm SEM.

Le test de l'adhésif présente un avantage vis-à-vis du test de retrait de la patte. En effet, il est difficile, avec le second test, de différencier précisément les effets de notre restriction d'activité neuromusculaire sur le système sensoriel des effets sur le système moteur. Ce test détermine la variation du nombre de retraits de patte avant et après une situation sans pour autant nous permettre d'identifier la cause de cette variation (diminution de la sensibilité ou incapacité à retirer la patte). Le test de l'adhésif dissocie ces deux aspects. Toutefois, il s'avère moins fiable en raison d'une grande variabilité inter- et intra-individuelle.

L'IGF-1 a des effets bénéfiques sur la latence d'enlèvement : il contrecarre les effets délétères de l'HH. En revanche, lorsqu'il est appliqué en condition d'HH, l'IGF-1 semble être responsable d'une plus mauvaise détection de l'adhésif. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer les problèmes de détection : (1) une difficulté à lever la patte antérieure, et donc, pour nous, à visualiser la détection de l'adhésif ; (2) un effet délétère de l'HH et/ou de l'IGF-1 sur le système sensoriel. En ce qui concerne la première hypothèse, nous savons en effet que la posture du rat est plus instable après HH, et que les muscles posturaux des pattes postérieures sont fortement affectés par l'HH. Par conséquent, le transfert du poids du corps vers l'arrière-train pour permettre de lever une patte antérieure s'avère difficile. Ce problème postural peut expliquer que le temps d'enlèvement de l'adhésif tend à augmenter pour le groupe HH. Toutefois, aucune différence n'est mise en évidence pour le temps de détection pour ce groupe. Un effet délétère de l'HH et/ou de l'IGF-1 sur le système sensoriel paraît peu probable. En effet, nous avons montré qu'au niveau cortical, l'HH comme l'IGF-1 entraînent une réponse des neurones du cortex somesthésique à des seuils plus faibles. En outre, l'IGF-1 est connu pour ses effets neuroprotecteurs (pour revue, Fernandez et Torres-Alemán, 2012).

2. Analyse cinématique

Une analyse de la locomotion a été effectuée au moyen de caméras CDD permettant la reconstruction 3D du mouvement de chaque articulation pendant la marche (Vicon). Ce protocole a déjà été utilisé au laboratoire (Canu et al. 2005 ; Garnier et al. 2008 ; Canu et Garnier 2009). Le jour précédant l'enregistrement, les rats sont anesthésiés légèrement (isoflurane), rasés, et la peau est tatouée afin de repérer les articulations et de placer

aisément nos marqueurs le jour de l'expérimentation. Ainsi, juste avant l'enregistrement, les marqueurs adhésifs reflétant les infrarouges (demi-sphères ; diamètre : 5 mm ; poids : 50 µg) sont placés sur l'articulation métatarso-phalangienne (MTP), la cheville, le genou, la hanche, le poignet, le coude, la 5^{ème} vertèbre lombaire et la 1^{ère} vertèbre thoracique. Les caméras recueillent la position de chaque marqueur dans l'espace et fournissent les coordonnées latérale, horizontale et verticale (respectivement X, Y et Z). Chaque rat effectue entre 3 et 6 passages de 5 à 10 pas consécutifs à vitesse constante dans un couloir de 1 m de longueur, avec des parois en plexiglas. La vitesse de marche des rats varie de 5 à 50 cm.s⁻¹. Les vitesses trop faibles (<20 cm.s⁻¹) ne correspondent pas à de la locomotion fluide ; à des vitesses trop élevées (>40 cm.s⁻¹), le patron locomoteur change et devient du trot (Gillis et Biewener 2001). Ainsi, l'analyse a été réalisée uniquement sur les passages dont la vitesse est comprise entre 20 et 40 cm.s⁻¹.

Les paramètres suivants ont été analysés (Figure 23) : (1) la longueur de l'enjambée de la patte postérieure ; (2) la rétraction et la protraction des pattes antérieures et postérieures ; ces paramètres sont évalués en mesurant la distance horizontale entre le marqueur de la hanche (ou de la 1^{ère} vertèbre thoracique pour les pattes antérieures) et du MTP (ou du poignet pour les pattes antérieures), à la fin (levé) et au début (posé) de la phase d'appui ; (3) la hauteur du pas, calculée comme étant la hauteur maximale du MTP (ou du poignet) lors de la phase de transfert ; (4) la distance et (5) le délai entre le posé des pattes antérieures et postérieures homolatérales ; (6) la relation de phase $\Phi=(A_r-A_v)/DC$, qui correspond au délai entre les posés des pattes homolatérales divisé par la durée du cycle de la patte antérieure correspondante, calculée entre 2 contacts successifs ; (7) l'oscillation du bassin, lors d'un pas, estimée en calculant l'angle maximal formé par une ligne passant par les deux hanches par rapport à l'horizontale, dans le plan frontal ; (8) les variations angulaires de la cheville, du genou et de la hanche.

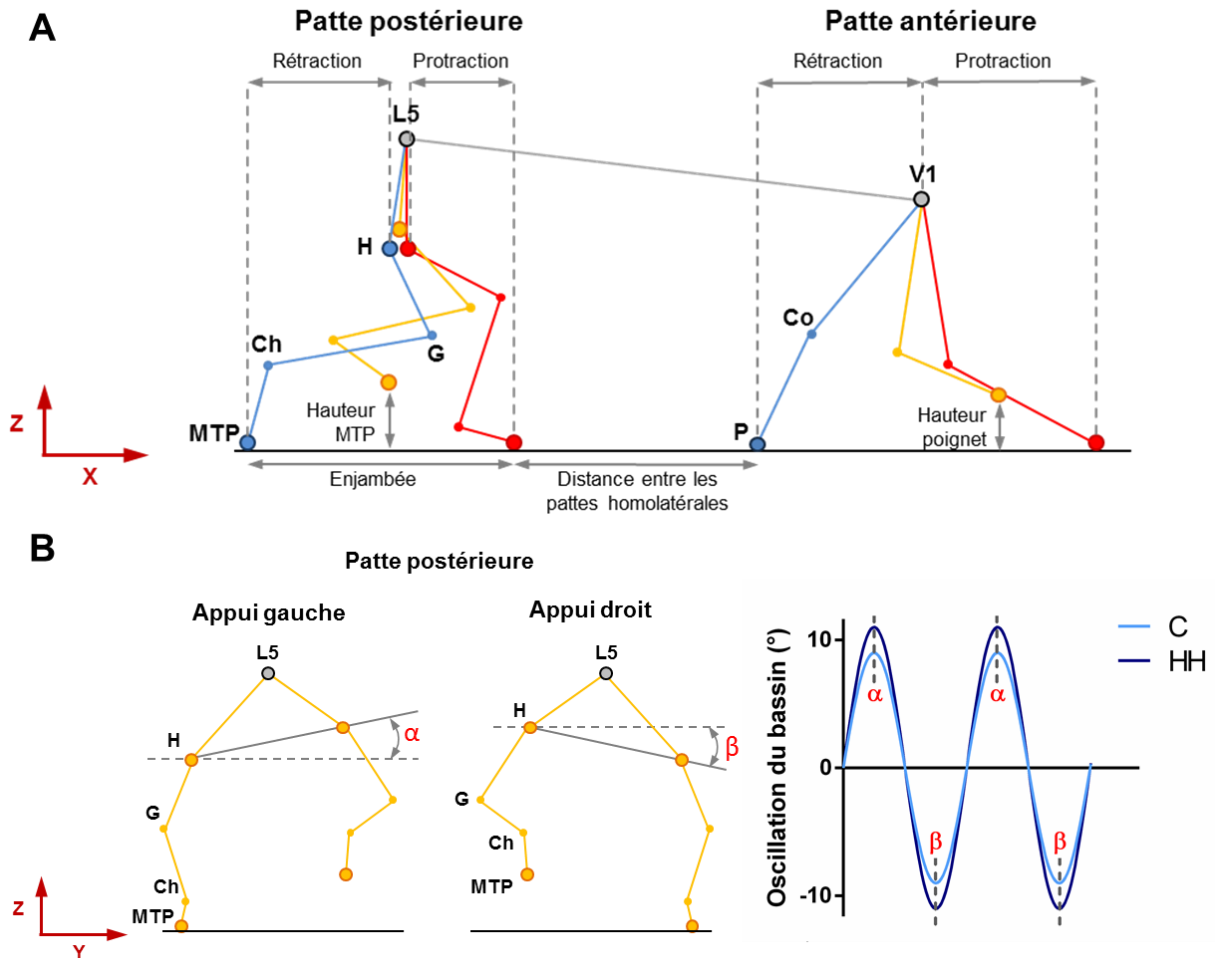


Figure 23 : Paramètres analysés lors de l'étude cinématique de la marche du rat. Les schémas représentent le positionnement des différents marqueurs articulaires (MTP : articulation métatarso-phalangienne, Ch : cheville, G : genou, H : hanche, L5 : 5^{ème} vertèbre lombaire, P : poignet, Co : coude, V1 : 1^{ère} vertèbre thoracique). Les segments bleus représentent les membres à la fin de la phase d'appui ; en jaune, pendant la phase de transfert ; en rouge, à la fin de la phase de transfert. (A) Cette représentation d'un pas sur un plan sagittal renseigne sur différents paramètres spatiaux et angulaires. (B) Cette représentation des pattes postérieures sur un plan frontal (à gauche) indique l'angle utilisé ($|\alpha| + |\beta|$) pour analyser l'oscillation du bassin. La courbe (à droite) représente un tracé théorique des angles obtenus chez des rats C et HH.

Paramètres spatiaux

Nos résultats montrent que la longueur de l'enjambée n'est affectée ni par l'HH ni par le traitement à l'IGF-1. La valeur moyenne est de 125 mm dans chacun des 4 groupes.

Concernant la protraction et la rétraction des pattes postérieures (Figure 24), l'HH diminue fortement la protraction [-33 %, $F(1,433)=471.2$, $p<0.001$] et augmente la rétraction [+57 %, $F(1,433)=226.0$, $p<0.001$]. Ainsi, en accord avec les études précédentes (Canu et al.

2005 ; Canu et Garnier 2009), le rat projette moins sa patte postérieure vers l'avant, et finit sa phase d'appui en hyperextension. L'administration d'IGF-1 chez des rats « terrestres » a un effet modéré sur la protraction (-6 %, $p < 0.001$) et n'affecte pas la rétraction (-4 %, ns). En situation d'HH, l'IGF-1 ne prévient pas les effets de l'HH sur la projection de la patte vers l'avant ou sur l'extension maximale vers l'arrière (-45 %, $p < 0.001$ et +59 %, $p < 0.001$ respectivement, par rapport au groupe C). En ce qui concerne la patte antérieure, aucun effet de l'HH n'est observé. Toutefois, nos résultats montrent une interaction $HH \times IGF-1$ pour la protraction [$F(1,421)=7.49$, $p < 0.01$] comme pour la rétraction [$F(1,421)=5.37$, $p < 0.05$] de la patte. L'HH comme l'administration d'IGF-1 entraînent une légère (mais non significative) diminution de la projection vers l'avant et une augmentation de l'extension vers l'arrière. Chez les rats HH-IGF-1, ces valeurs sont proches de celles observées chez les rats C.

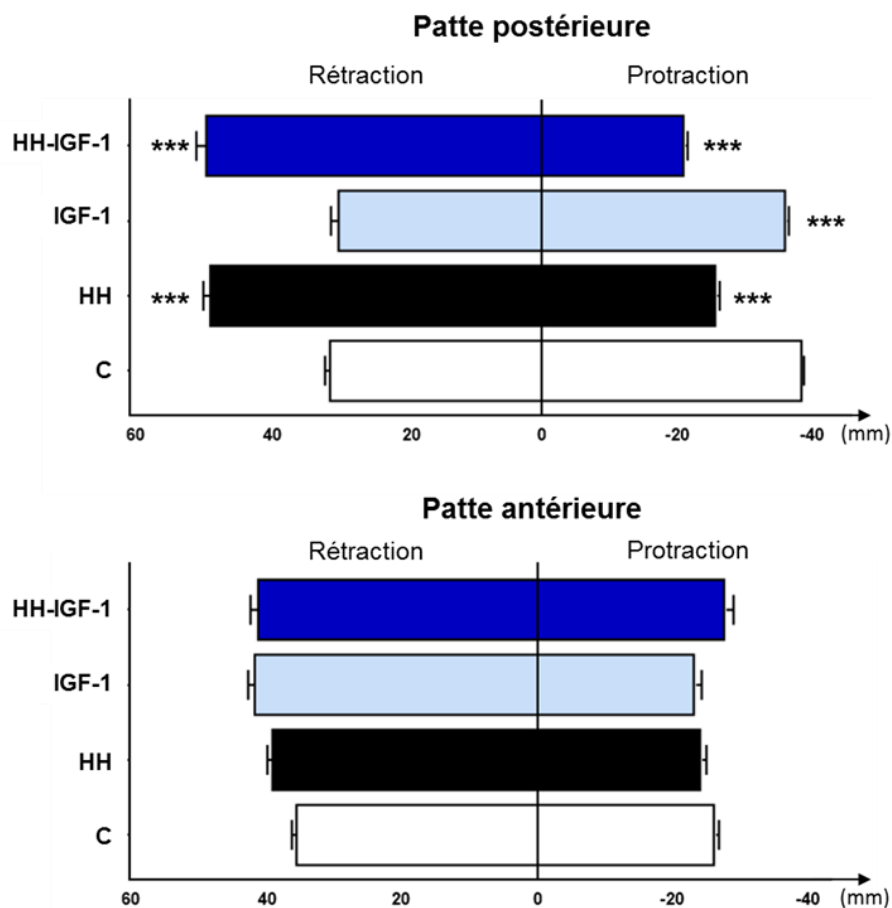


Figure 24 : Distance de rétraction et protraction des pattes antérieures et postérieures. Les diagrammes représentent, pour les pattes postérieures (en haut) et antérieures (en bas), la distance de projection de la patte vers l'avant (protraction : $X_{\text{Hanche}} - X_{\text{MTP}} < 0$) et l'extension de la patte en fin de phase d'appui (rétraction : $X_{\text{Hanche}} - X_{\text{MTP}} > 0$) pour les rat C, HH, IGF-1 et HH-IGF-1. *** correspond à une différence significative ($p < 0.001$) par rapport au groupe C. Les valeurs présentées sont les moyennes \pm SEM.

La hauteur maximale des MTP et des poignets pendant la phase de transfert a également été mesurée (Figure 25A et B). L'HH entraîne une augmentation de cette valeur. En effet, les rats HH [MTP : $F(1,433)=31.2$, $p<0.001$; poignet: $F(1,421)=53.1$, $p<0.001$], tout comme les rats HH-IGF-1 [MTP : $F(1,433)=6.2$, $p<0.05$; poignet : $F(1,421)=4.9$, $p<0.05$] décollent davantage leur patte du sol lors du transfert. Cette observation peut s'expliquer par une plus grande oscillation du bassin dans le plan frontal (Figure 25F). En condition contrôle, l'amplitude de l'oscillation est de $18.4^\circ \pm 0.3$. L'HH augmente cette valeur (+15 %, $p<0.001$). En condition d'HH, chaque pas nécessite une oscillation importante du bassin pour lever le pied. De manière surprenante, l'administration d'IGF-1 chez un rat « terrestre » diminue cette amplitude (-8 %, $p<0.001$) alors qu'en condition d'HH elle l'accroît (+42 %, $p<0.001$ par rapport au groupe C ; +23 %, $p<0.001$ par rapport au groupe HH).

Coordination entre les membres

Le décalage entre le moment où la patte postérieure se pose sur le sol et le moment où l'antérieure se lève (Figure 25C) est en moyenne de 3 ± 2 ms chez les rats C, autrement dit, la patte postérieure se pose quasiment au moment où la patte antérieure se lève. Chez les rats HH, ce délai augmente de 16 ms [$F(1,387)=54.63$, $p<0.001$], c'est-à-dire que la patte postérieure se pose bien après que l'antérieure s'est levée. Chez un rat « terrestre », l'administration d'IGF-1 ne semble pas avoir d'effet sur ce délai alors qu'en condition d'HH, l'IGF-1 induit une augmentation très importante de ce délai (+34 ms, $p<0.001$).

Concernant la distance entre les membres homolatéraux (Figure 25D), l'analyse statistique montre un effet de l'IGF-1 [$F(1,380)=29.51$, $p<0.001$] et une interaction $HH \times IGF-1$ [$F(1,380)=39.75$, $p<0.001$]. Chez le rat C, la patte postérieure se place en moyenne 15 ± 1 mm en arrière de la place occupée par la patte antérieure. Cette écart augmente de 60 % après une période d'HH ($p<0.001$). Cette variation peut s'expliquer par la diminution de la protraction retrouvée chez les rats HH. Chez les rats IGF-1, aucune variation n'est observée (+9 %, *ns*). En revanche, cet écart est fortement réduit dans le groupe HH-IGF-1 (-65 % par rapport au C, $p<0.001$). Cette diminution peut sembler curieuse au regard de la protraction

plus faible observée chez les animaux de ce groupe. Toutefois, elle peut s'expliquer en prenant en considération le délai entre le moment où la patte postérieure se pose sur le sol et le moment où le membre antérieur se lève. En effet, chez les rats HH-IGF-1, l'animal pose sa patte postérieure bien après le levé de la patte antérieure. Pendant ce délai, le corps de l'animal continue de progresser vers l'avant. Ce délai allongé chez les rats du groupe HH-IGF-1 peut donc expliquer la distance réduite entre les posés des membres homolatéraux.

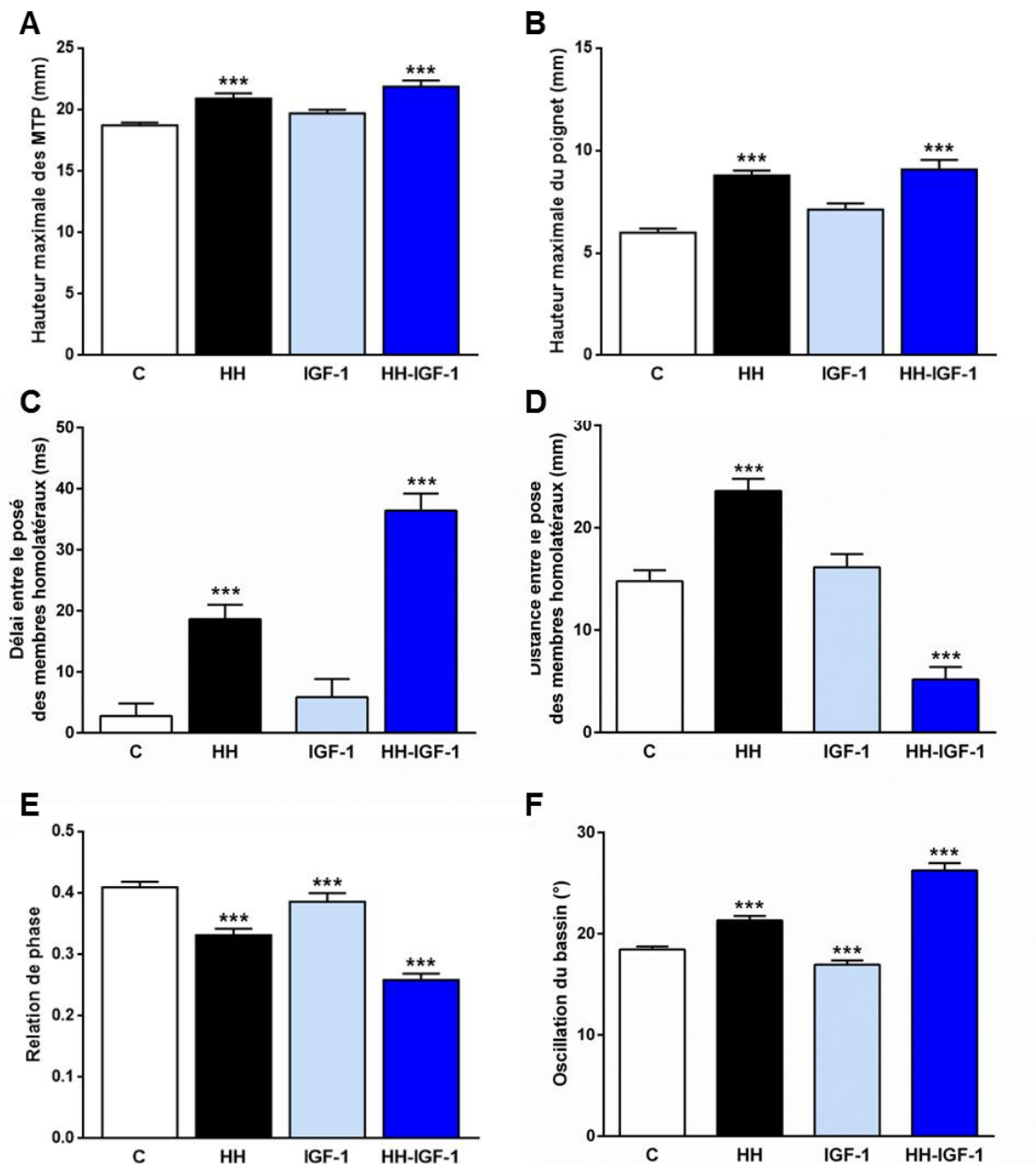


Figure 25 : Analyse spatiale et de la coordination entre les membres du rat. Les histogrammes représentent la hauteur maximale pendant la phase de transfert des MTP (A) et du poignet (B) ; le délai (C) et la distance (D) entre le posé de la patte postérieure et le levé de la patte antérieure ; la relation de phase (E) et l'amplitude des oscillations du bassin (F). *** correspond à une différence significative ($p < 0.001$) par rapport au groupe C. Les valeurs présentées sont les moyennes \pm SEM.

La relation de phase entre les membres homolatéraux est de 0.40 ± 0.01 chez le rat contrôle (Figure 25E). Ces résultats sont en accord avec des études antérieures (Górska et al. 1999 ; Canu et Garnier 2009) et correspondent à un patron diagonal. Toutefois, il faut noter que pour 18 % des pas, la valeur est supérieure à 0.50, ce qui est caractéristique d'un patron latéral. Une situation d'HH, comme une administration d'IGF-1, diminue la valeur de la relation de phase. Cette valeur passe à 0.38 chez les rats IGF-1 [$F(1,343)=11.97, p<0.001$] et à 0.33 chez les rats HH [$F(1,387)=54.66, p<0.001$]. De plus, ces effets sont cumulatifs puisque chez un rat HH-IGF-1, la relation de phase passe à 0.25 [$F(1,343)=13.24, p<0.001$]. Dans ce dernier groupe, toutes les valeurs sont inférieures à 0.5, ce qui signifie que le patron latéral a totalement disparu.

Analyse angulaire

Les valeurs des angles des différentes articulations sont présentées dans le Tableau 2. Au niveau de la cheville, l'administration d'IGF-1 chez un rat « terrestre » n'entraîne pas de variation des valeurs des angles aux moments clés du cycle (de -4 à +7 % ; *ns*). En revanche, l'HH augmente de façon importante l'ouverture de la cheville : +9 % au posé ($p<0.001$), +8 % au levé ($p<0.001$), +15 % ($p<0.001$) et +61 % ($p<0.001$) pour les valeurs minimales au cours de la phase d'appui et de transfert respectivement. Cette augmentation est retrouvée chez les rats HH-IGF-1 lors du posé (+7 % ; $p<0.01$) ou lors de la phase de transfert (+27 % ; $p<0.001$), bien que de façon moins prononcée.

L'analyse angulaire du genou montre que les angles au posé ne varient pas pour aucun des groupes (de -3 à +2 % ; *ns*). De plus, l'administration d'IGF-1 ne change pas l'angle du genou au levé (+0 % ; *ns*) ou lors de l'appui (+3 % ; *ns*). En revanche, elle l'augmente lors du transfert (+7 % ; $p<0.01$). Enfin, comme au niveau de la cheville, une augmentation très marquée est observée dans les groupes HH (de 26 à 29 % ; $p<0.001$) et HH-IGF-1 (de 11 à 21 % ; $p<0.001$) bien que moins sévère dans le second groupe.

Au niveau de la hanche, l'IGF-1 entraîne une augmentation de l'angle dans chacune des conditions (de 4.5 à 7 % ; $p<0.001$). A l'inverse, l'angle de la hanche est fortement

diminué en HH (-11 à -16 % ; $p < 0.001$). L'administration d'IGF-1 chez les rats HH permet de limiter cette diminution (-5 à -15 % ; $p < 0.001$).

Ainsi, d'une façon générale (Figure 26), l'IGF-1 n'affecte pas les angles articulaires de la cheville et du genou mais augmente les angles de la hanche. L'HH induit de fortes variations angulaires au niveau de chaque articulation. Chez les rats HH-IGF-1, ses variations sont toujours présentes bien que plus modérées. Ces fortes variations angulaires peuvent paraître surprenantes dans la mesure où nos résultats montrent que l'HH augmente la hauteur du pied lors de la phase de transfert. En effet, une augmentation des angles de la cheville et du genou se traduit par une flexion de la jambe plus faible lors du pas, ce qui devrait se traduire par un levé du pied moins haut. Toutefois, nos résultats montrent également une forte diminution de l'angle de la hanche d'une part, et une augmentation de l'amplitude des oscillations du bassin d'autre part. Pris dans leur ensemble, ces résultats concordent avec des études précédentes (Canu et al. 2005 ; Canu et Garnier 2009) et nous amènent à penser que la marche du rat est fortement altérée par l'HH.

		C	HH	IGF-1	HH-IGF-1
Cheville (°)	Posé	112.3 ± 1.0	122.7 ± 2.3***	108.1 ± 1.5	119.7 ± 2.4**
	Levé	111.5 ± 0.9	120.2 ± 2.3***	110.4 ± 1.3	114.1 ± 1.9
	Min (appui)	62.7 ± 1.0	72.2 ± 1.9***	66.7 ± 1.5	63.2 ± 1.9
	Min (transfert)	38.5 ± 0.6	62.0 ± 1.6***	41.2 ± 1.0	49.0 ± 0.9***
Genou (°)	Posé	109.2 ± 0.6	108.8 ± 1.6	111.8 ± 1.1	105.7 ± 0.8
	Levé	65.4 ± 0.7	84.5 ± 1.8***	65.5 ± 0.9	78.5 ± 0.9***
	Min (appui)	57.6 ± 0.6	72.5 ± 1.6***	59.4 ± 0.7	69.4 ± 0.7***
	Min (transfert)	46.6 ± 0.5	59.1 ± 1.2***	50.0 ± 0.6**	51.7 ± 0.4***
Hanche (°)	Posé	119.1 ± 0.4	105.6 ± 1.0***	127.4 ± 0.5***	113.7 ± 0.4***
	Levé	128.2 ± 0.4	107.8 ± 1.9***	134.0 ± 0.5***	118.6 ± 0.6***
	Min (appui)	115.8 ± 0.4	102.0 ± 0.8***	122.1 ± 0.4***	110.6 ± 0.5***
	Min (transfert)	118.4 ± 0.4	104.4 ± 0.9***	126.6 ± 0.4***	113.0 ± 0.4***

Tableau 2 : Analyse des variations angulaires de la cheville, du genou et de la hanche du rat. Pour la cheville, le genou et la hanche de rats C, HH, IGF-1 et HH-IGF-1, posé et levé représentent l'angle de l'articulation au début et à la fin de la phase d'appui ; Min (appui) et Min (transfert) représentent l'angle minimal de l'articulation respectivement pendant la phase d'appui et la phase de transfert. *** et ** correspondent à des différences significatives (respectivement $p < 0.001$ et $p < 0.01$) par rapport au groupe C. Les valeurs présentées sont les moyennes ± SEM.

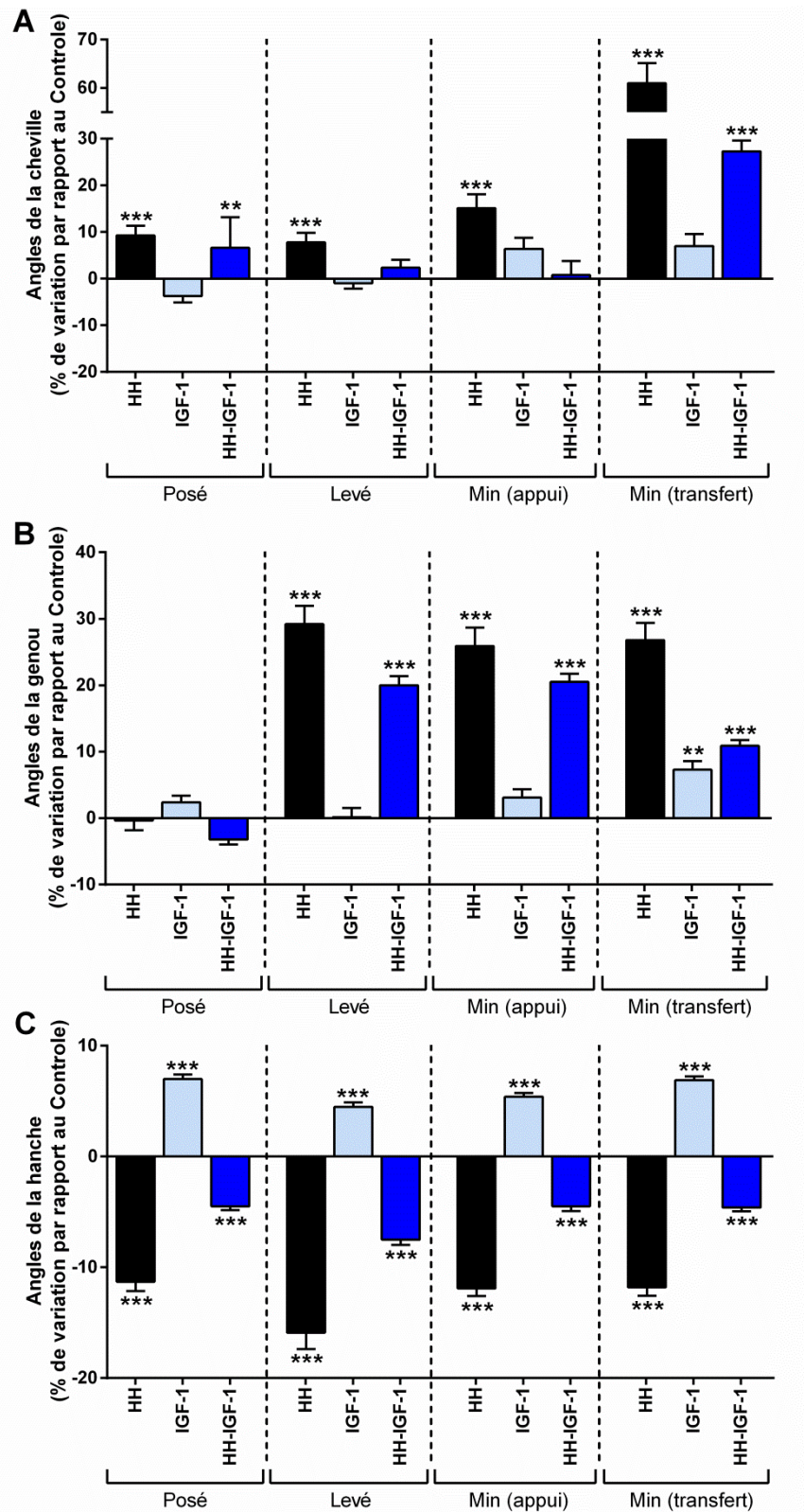


Figure 26 : Variations angulaires des différentes articulations par rapport au groupe Contrôle. Les histogrammes représentent le pourcentage de variation par rapport aux valeurs du groupe C pour les angles de la cheville (A), du genou (B) et de la hanche (C), au posé et au levé (angle de l'articulation au début et à la fin de la phase d'appui) et les minima pendant les phases d'appui (Min appui) et de transfert (Min transfert) pour les groupes HH, IGF-1 et HH-IGF-1. *** et ** correspondent à des différences significatives (respectivement $p < 0.001$ et $p < 0.01$) par rapport au groupe C. Les valeurs présentées sont les moyennes \pm SEM.

L'analyse cinématique de la locomotion montre un effet très marqué de l'HH. Ces résultats concordent avec ceux d'études précédentes (Canu et al. 2005 ; Canu et Garnier 2009). Ainsi, pour les pattes postérieures, les principaux effets de l'HH sont une hyperextension en fin de phase d'appui, une moindre flexion lors de la phase de transfert, compensée par une plus forte oscillation du bassin, et une diminution de la protraction.

Notre étude montre aussi que la longueur de l'enjambée n'est pas affectée par une période d'HH. Cette donnée peut paraître surprenante au regard de nos résultats obtenus sur l'échelle horizontale, où la longueur de l'enjambée diminuait après une période d'HH. Toutefois, ces deux types de marche mettent en jeu des mécanismes différents : la marche sur échelle correspond à une motricité dirigée impliquant des structures supraspinales (Beloozerova et Sirota 1993 ; Beloozerova et al. 2003), alors que la locomotion sur une piste horizontale fait principalement appel à des processus automatiques, et est organisée au niveau spinal (même si des études antérieures suggèrent que chez les rats HH, certains aspects du patron locomoteur sont organisés au niveau supraspinal plutôt que strictement dans la moelle épinière (Canu et al. 2005).

D'une façon générale, l'IGF-1 a peu d'effet lorsqu'il est appliqué sur des rats contrôles. De façon surprenante, l'administration de cette substance chez des rats soumis l'HH accentue certains effets de l'HH (notamment sur les paramètres temporels et spatiaux) et en prévient d'autres (paramètres angulaires). L'administration d'IGF-1 semble donc modifier le patron locomoteur. De façon subjective, nous avons remarqué que les rats du groupe HH-IGF-1 avaient une locomotion plus fluide que les rats du groupe HH. Cette impression est confirmée par le fait que la vitesse moyenne des différents épisodes locomoteurs que nous avons analysés était de l'ordre de 30 cm.s^{-1} pour l'ensemble des groupes, à l'exception du groupe HH où elle n'était que de 25 cm.s^{-1} . Dans une précédente étude cinématique, Canu et collaborateurs (2005) avaient remarqué qu'une semaine de récupération après un épisode d'HH permettait de restaurer une bonne performance locomotrice, bien que le mouvement des membres postérieurs reste différent de celui observé avant l'HH. Ainsi, nous formulons l'hypothèse que l'IGF-1, en modifiant le patron locomoteur, a des effets bénéfiques en termes de « performance » motrice. Une réorganisation de la commande motrice au niveau supraspinal induit des changements subtils de certains paramètres cinématiques, qui permettent de compenser les effets de l'HH

sur le muscle (atrophie, perte de force...). Les résultats de l'actimétrie soutiennent cette hypothèse.

F. Conclusion

Ces études ont permis de mettre en évidence qu'une administration d'IGF-1, pendant toute la durée de l'HH, prévenait en partie les réorganisations corticales des cortex somesthésique et moteur induites par l'HH. De plus, l'altération de la performance sensorimotrice observée chez les rats soumis à l'HH est limitée par cette administration corticale d'IGF-1. Ainsi, nos résultats indiquent clairement que l'IGF-1 joue un rôle clé dans les mécanismes de plasticité corticale et d'altération comportementale induits par une réduction de l'activité sensorimotrice.

G. Articles

Role of IGF-1 in cortical plasticity and functional deficit induced by sensorimotor restriction.

J.Mysoet, E. Dupont, B. Bastide, M.H. Canu

Behav Brain Res. (2015) 290:117-23. doi: 10.1016/j.bbr.2015.04.055.

Conception de l'étude, élaboration du protocole : JM ED MHC

Réalisation des expériences : JM

Analyse des données : JM ED MHC

Écriture de l'article : JM ED MHC BB

Reorganization of motor cortex and degradation of motor performance induced by hindlimb unloading are alleviated by cortical IGF-1 administration

J.Mysoet, M.H. Canu, B. Bastide, E. Dupont

Soumis à J Physiol London

Conception de l'étude, élaboration du protocole : JM ED MHC

Réalisation des expériences : JM

Analyse des données : JM ED MHC

Écriture de l'article : JM ED MHC BB

PARTIE 3

DISCUSSION GENERALE

L'ensemble des travaux expérimentaux réalisés au cours de ma thèse ont concouru à développer nos connaissances sur la réorganisation corticale induite par l'HH et ses conséquences fonctionnelles. Je me suis plus particulièrement intéressé à une molécule connue pour ses effets trophiques : l'IGF-1.

Dans un premier temps, j'ai exploré l'effet d'une période d'HH sur l'IGF-1 plasmatique et au niveau de plusieurs structures cérébrales impliquées dans le contrôle moteur. Cette étude m'a permis de révéler un effet sévère de l'HH sur le système IGF-1, et ce, spécifiquement dans le cortex sensorimoteur. J'ai alors voulu déterminer si, en maintenant le taux d'IGF-1 dans le cortex sensorimoteur pendant toute la durée de l'HH, il était possible de prévenir la réorganisation corticale et la dégradation de la performance sensorimotrice induites par l'HH. Je me suis donc attaché dans un second temps à évaluer les effets d'une administration d'IGF-1 au niveau cortical sur les cortex somesthésique et moteur. En parallèle, j'ai tenté de déterminer si l'administration d'IGF-1 avait une conséquence fonctionnelle, en termes de sensibilité tactile et de performance motrice. Mes résultats montrent que l'administration d'IGF-1 au niveau cortical prévient en partie les effets de l'HH sur le cortex et sur le comportement moteur (Figure 27).

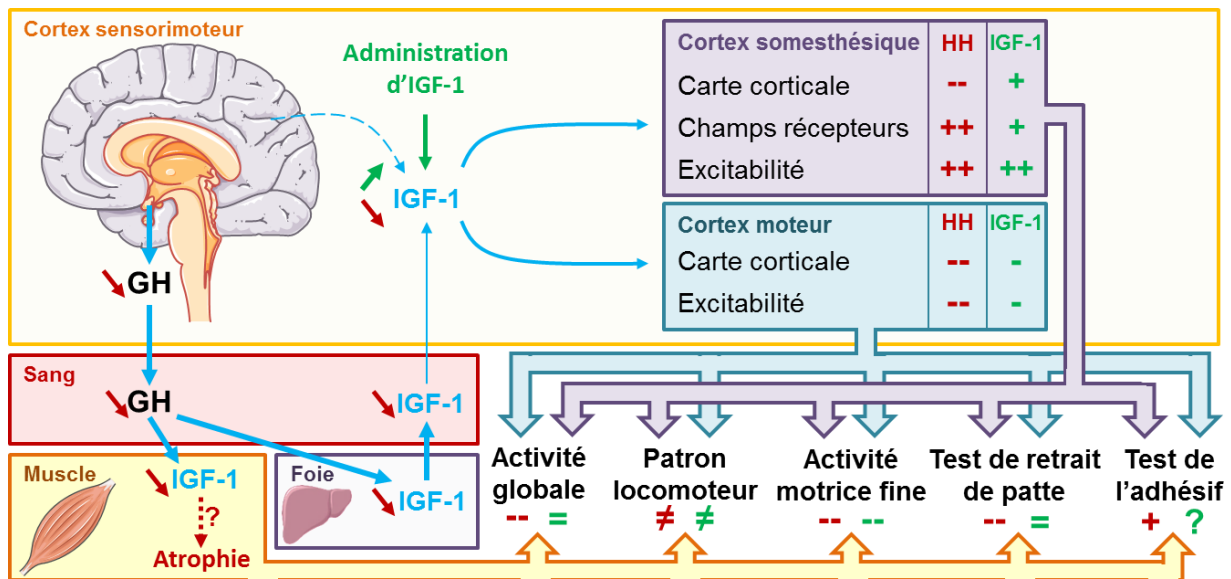


Figure 27 : Synthèse des effets de l'HH et de l'IGF-1 dans la réorganisation corticale et la dégradation de la performance sensorimotrice induites par l'HH. L'HH (en rouge) entraîne une diminution des taux de GH qui a pour conséquence une baisse générale des taux d'IGF-1 (cérébral, plasmatique, musculaire). Au niveau du muscle, cette diminution pourrait contribuer à l'atrophie observée. Au niveau cérébral, cette diminution d'IGF-1 pourrait être impliquée dans les réorganisations des cortex somesthésique et moteur. Ces réorganisations sont corrélées à une dégradation de la performance sensorimotrice. L'administration d'IGF-1 chez un rat soumis à l'HH (en vert) permet d'augmenter les taux d'IGF-1 cérébraux. Cette augmentation prévient partiellement les réorganisations corticales induites par l'HH. Cette prévention se traduit, au niveau de la performance sensorimotrice, par une activité globale plus importante (similaire à un rat contrôle), un patron locomoteur plus fluide et un meilleur score au test de retrait de la patte par rapport à un rat HH. En revanche il n'a pas d'effets sur l'activité motrice fine.

Les taux d'IGF-1 sont-ils affectés par une période d'HH ?

A l'heure actuelle, plusieurs auteurs considèrent l'IGF-1 comme une molécule centrale, à l'origine de nombreux mécanismes tant au niveau du système nerveux central qu'en périphérie (Grounds, 2002 ; Torres-Aleman, 2010). L'IGF-1 est connu pour être un médiateur des effets bénéfiques de l'activité physique au niveau cérébral. Il semblait donc naturel de se questionner sur les effets de l'hypoactivité sur le système IGF-1. **Notre hypothèse était que l'hypoactivité entraînerait une diminution des taux plasmatiques et corticaux d'IGF-1.** Notre première étude a révélé qu'en effet, l'HH entraîne une baisse des taux d'IGF-1 plasmatiques, associée à une baisse des taux d'IGF-1 cérébraux particulièrement marquée dans le cortex sensorimoteur. Ces changements sont associés à

des modifications d'activation de la voie de signalisation PI3K/AKT. La baisse du taux d'IGF-1 cérébral peut s'expliquer par une diminution de l'entrée d'IGF-1 via les plexus choroïdes (Carro et al. 2005), due à la baisse d'IGF-1 plasmatique. La réduction importante des taux d'IGF-1 au niveau du cortex sensorimoteur semble, quant à elle, être liée à la diminution de l'activité du cortex sensorimoteur pendant la période d'HH. En effet, Nishijima et collaborateurs (2010) ont montré que l'entrée d'IGF-1 dans le cerveau via la barrière hémato-encéphalique se fait spécifiquement dans les zones cérébrales actives.

L'IGF-1, médiateur de la réorganisation corticale induite par l'HH ?

La première étude a révélé que l'effet de l'HH sur l'IGF-1 est bien plus marquée sur le cortex sensorimoteur que sur les autres structures. Par ailleurs, de nombreuses études ont montré que le cortex sensorimoteur est particulièrement affecté par l'hypoactivité. En effet, **l'HH entraîne une profonde réorganisation corticale**. Au niveau du cortex moteur, elle se caractérise, aussi bien chez l'homme que chez l'animal, par une diminution de l'aire de représentation des membres inférieurs (postérieurs) (Liepert et al. 1995 ; Langlet et al. 2012) et une augmentation de l'excitabilité (Roberts et al. 2007 ; Langlet et al. 2012). Au niveau du cortex somesthésique, une diminution de l'aire de représentation du membre immobilisé (Coq et Xerri, 1999 ; Langlet et al. 1999 ; Lissek et al. 2009 ; Langer et al. 2012) et une diminution de l'excitabilité corticale sont observées (Dupont et al. 2003). Des études effectuées sur l'animal ont permis de mieux appréhender les mécanismes impliqués dans ces réorganisations. Il apparaît donc que ces réorganisations corticales dépendent de certains neurotransmetteurs (GABA : D'Amelio et al. 1996 ; Canu et al. 2006 ; dopamine : Hosp et al., 2009 ; acétylcholine: Dupont et al., 2002) ou neurotrophines (NGF : Dupont et al. 2005, 2011), et de leurs voies de signalisation associées (Pi3K-AKT et MAPK : Dupont et al. 2011).

Comme décrit dans la deuxième partie de la revue bibliographique, l'IGF-1 est connu pour ses nombreuses actions au niveau cérébral. Cet effet, visiblement global, a amené Torres-Aleman (2010) à le placer comme étant au centre des mécanismes corticaux en lien avec l'exercice physique. L'IGF-1 est capable de moduler l'excitabilité neuronale, les taux de certains neurotransmetteurs comme le GABA (Maya-Vetencourt et al. 2012) ou l'acétylcholine (Nilsson-Håkansson et al. 1993), et l'activité de neurotrophines (Ding et al.

2006 ; Chen et Russo-Neustadt, 2007). A la lumière de ces informations, il semble naturel de **s'interroger sur l'influence de l'IGF-1 dans la réorganisation corticale induite par l'HH**. L'IGF-1 serait-il l'un des acteurs de cette réorganisation ? Afin de répondre à cette question, nous avons administré de l'IGF-1 dans le cortex des rats pendant toute la période de l'HH. Notre hypothèse était que d'IGF-1 devrait prévenir la réorganisation corticale induite par l'HH. Nos études ont montré que cette administration d'IGF-1 prévenait totalement la réorganisation du cortex somesthésique, limitait partiellement l'élargissement des champs récepteurs cutanés, la réorganisation et l'augmentation d'excitabilité du cortex moteur, mais n'avait pas d'effet sur les seuils d'excitabilité du cortex somesthésique.

Ces résultats révèlent donc que **l'IGF-1 joue un rôle important dans les mécanismes de plasticité corticale induits par l'HH**. Ils indiquent également que **toutes les altérations ne peuvent pas être prévenues par une simple administration d'IGF-1 cortical**. Les études présentées dans ce mémoire, en corrélation avec des études précédentes, ont démontré que les mécanismes contrôlant les différentes réorganisations corticales, les seuils d'excitabilité ou les champs récepteurs étaient différents (Tableau 3). En effet, Dupont et collaborateurs (2011) avaient observé que l'administration d'un antagoniste de la voie des MAP kinases n'avait pas d'effet sur les champs récepteurs cutanés mais prévenait la réduction de l'aire de représentation du cortex somesthésique. De plus, ces différents paramètres étudiés ont une cinétique différente (Dupont et al. 2001 ; Rosselet et al. 2006). Enfin, l'étude des différents mécanismes moléculaires impliqués dans la plasticité corticale, tend à montrer que certaines molécules seraient davantage impliquées dans l'un ou l'autre de ces paramètres, et l'IGF-1 ne semble pas avoir d'influence sur tous ces neurotransmetteurs. Par exemple, les taux de GABA sont diminués à la fois par l'administration d'IGF-1 et par l'HH. En ce qui concerne la dopamine, qui joue un rôle prépondérant dans la réorganisation du cortex moteur, les données issues de la littérature montrent que les seuls liens entre l'IGF-1 et la dopamine sont d'ordre pathologique (Ebert et al. 2008).

A	CORTEX SOMESTHESIQUE			CORTEX MOTEUR		
	Carte corticale	Champs récepteurs	Excitabilité	Carte corticale	Excitabilité	
1 - Hypodynamie - Hypokinésie	HU 14 jours	↘ (Langlet et al. 1999)	↗ (Dupont et al. 2003)	↗ (Dupont et al. 2003)	↘ (Langlet et al. 2012)	
	HU 28 jours	= (Dupont et al. 2011)	↗ (Dupont et al. 2011)			
	Immobilisation 7 jours	↘ (Coq et Xerri. 1999)	↗ (Coq et Xerri. 1999)			
	Immobilisation 14 jours	↘ (Coq et Xerri. 1999)	↗ (Coq et Xerri. 1999)		↘ (Viaro et al. 2014)	
	Immobilisation 30 jours				↘ (Viaro et al. 2014)	
	HU 14 j + Antagoniste des MAP kinases	= (Dupont et al. 2011)	↗ (Dupont et al. 2011)			
	HU 14 j + Antagoniste muscarinique	= (Dupont et al. 2002)	= (Dupont et al. 2002)			
	HU 14 j + IGF-1	↗ (Mysoet et al. 2015)	↗ (Mysoet et al. 2015)	↗ (Mysoet et al. 2015)	= (Mysoet, soumis)	↗ (Mysoet, soumis)
2 - Traitement	IGF-1	= (Mysoet et al. 2015)	↗ (Mysoet et al. 2015)	↗ (Mysoet et al. 2015)	= (Mysoet, soumis)	↗ (Mysoet, soumis)
	Augmentation de l'expression des NR2B	↗ (Rosselet et al. 2006)				
	Augmentation de la synthèse de GABA		↘ (Rosselet et al. 2006)			
	Antagoniste de la dopamine				↘ (Hosp et al. 2009)	↘ (Hosp et al. 2009)
B	GABA	Dopamine	NGF	BDNF	IGF-1	
HU 14 jours	↘ (Canu et al. 2006) (D'Amelio et al. 1986)	↘ (Canu, non publié) (Miller et al. 1989)	↗ (Dupont et al. 2005)	= (Dupont et al. 2005)	↘ (Mysoet et al. 2014)	
IGF-1	↘ (Maya-Vetencourt et al. 2012)			↗ (Carro et al. 2000)		

Tableau 3 : Tableau récapitulatif des effets de l'HH sur le cortex sensorimoteur, et des mécanismes de la plasticité. A1. Effets de l'HH avec ou sans traitement. A2. Effet de différents neurotransmetteurs sur les cortex somesthésiques et moteur. B. Effets d'une situation d'HH et de l'IGF-1 sur différents neurotransmetteurs et neurotrophines. Les effets sont donnés par rapport à un rat contrôle. HU : *hindlimb unloading*, modèle animal d'HH.

D'autres acteurs doivent donc être impliqués dans cette plasticité corticale. Récemment, López-Hidalgo et Schummers (2014) se sont interrogés sur les **rôles potentiels de la glie, et plus particulièrement des astrocytes, dans les phénomènes de plasticité corticale**. Ces cellules, en plus d'un rôle de structuration, participent activement à l'homéostasie et à la communication neuronale. La membrane astrocytaire possède des récepteurs aux neurotransmetteurs qui permettent à l'astrocyte de détecter l'activité neuronale. En réponse, ils peuvent excréter des gliotransmetteurs (glutamate, D-sérine, ATP) qui modulent la transmission synaptique. De plus, il est important de noter que les astrocytes ne fonctionnent pas isolément mais en réseau. Ce réseau astrocytaire est assuré au moyen de jonctions communicantes majoritairement formées par les connexines 43 et 30. Les jonctions créées par ces protéines permettent le passage d'ions ou de petites molécules d'un astrocyte à l'autre (pour revue Halassa et al. 2007). Au niveau du cortex somatosensoriel des vibrisses de la souris, le réseau astrocytaire d'une cellule aurait tendance à s'étendre de manière préférentielle dans une zone qui se superpose à l'aire de représentation d'une vibrisse (Houades et al. 2008). Enfin, les astrocytes sont sensibles aux effets de l'IGF-1. L'administration d'IGF-1 sur une culture d'astrocytes augmente l'expression des connexines 43 (Åberg et al. 2003) renforçant donc le réseau astrocytaire. Ainsi, la diminution des taux d'IGF-1 pourrait entraîner un affaiblissement du réseau astrocytaire qui favoriserait la réduction de l'aire de représentation corticale observée en HH. Néanmoins, l'influence réelle du réseau astrocytaire sur les cartes corticales est encore mal connue. Il serait intéressant de développer ce point dans de futures études.

La prévention de la réorganisation corticale peut-elle prévenir la dégradation de la performance sensorimotrice ?

Nos études ont mis en avant une prévention par l'IGF-1, bien que partielle, des effets de l'HH au niveau cortical. La question qui en découle est de savoir si **cette prévention de la réorganisation corticale peut empêcher la dégradation de la performance dans une tâche motrice ou de discrimination sensorielle**. Dans la littérature, la taille des cartes corticales est souvent corrélée à la performance motrice. Par exemple, chez l'homme, Lissek et collaborateurs (2009) ont montré qu'une immobilisation des doigts entraîne une réduction

de l'aire de représentation au niveau du cortex somesthésique. Cette réduction est corrélée à une diminution de la discrimination tactile. Chez l'animal, la diminution de la représentation des pattes postérieures au niveau des cortex somesthésique (Langlet et al. 1999) comme moteur (Langlet et al. 2012) est associée à une profonde dégradation de la performance motrice (Canu et al. 2005 ; Canu et Garnier, 2009). Comme l'ont précisé Clark et collaborateurs (2006), cette dégradation n'est pas uniquement due à des facteurs musculaires (atrophie, changement phénotypique, perte de force) mais aussi à une réorganisation du système nerveux. Cette conclusion est confirmée par une étude montrant que l'administration de clenbuterol, molécule connue pour induire une hypertrophie musculaire, permet de limiter les effets de l'HH sur le muscle (Ricart-Firinga et al. 2000) mais n'a aucun effet sur la dégradation de la locomotion (Canu et al. 2001b). Ainsi, notre hypothèse était que lors de l'HH, l'effet bénéfique de l'IGF-1 sur la réorganisation corticale pourrait prévenir la dégradation de la performance motrice. Nos études montrent qu'une administration d'IGF-1 au niveau cortical prévient totalement la diminution de l'activité spontanée des rats, induit l'apparition d'un nouveau patron locomoteur, mais n'a pas d'effet sur la dégradation de l'activité motrice fine. Ainsi, nos études démontrent qu'une variation d'un facteur de croissance dans une zone localisée du cerveau peut être responsable de changements aussi généraux que peut l'être l'organisation d'un patron locomoteur.

Dans la mesure où la locomotion sur une échelle horizontale nécessite des mouvements précis et implique donc les structures supraspinales (Beloozerova et Sirota 1993 ; Beloozerova et al. 2003), nous pensions que l'infusion d'IGF-1 dans le cortex sensorimoteur serait particulièrement efficace pour prévenir les effets de l'HH dans ce test. En réalité, l'IGF-1 n'a eu aucun effet bénéfique. Nous expliquons ce résultat par le fait que l'organisation des mouvements dirigés qui nécessitent l'intégration d'informations sensorielles dépend non seulement de l'intégrité du cortex moteur, mais aussi du striatum (Whishaw et al. 1986). Or, (1) nous avons montré que le taux d'activation des récepteurs à l'IGF-1 est fortement diminué (-60 %) dans le striatum ; (2) l'IGF-1 que nous avons appliqué en surface du cortex ne diffuse pas jusqu'au striatum. Il serait intéressant par la suite de réaliser une infusion intra-cérébro-ventriculaire d'IGF-1 afin de déterminer si une action plus large au niveau cérébral permet d'améliorer ses effets préventifs.

La locomotion est une activité motrice automatique. Elle nécessite l'activation synchronisée de muscles fléchisseurs et extenseurs de l'ensemble du corps afin de maintenir l'organisme dans une posture adéquate et permettre son déplacement dans son environnement. Elle est initiée par des centres supraspinaux, mais le patron est organisé au niveau spinal (CPG) et est régulé par un grand nombre d'afférences sensorielles d'origine périphérique, notamment cutanées et proprioceptives. Cela peut expliquer pourquoi l'administration corticale d'IGF-1 chez un rat normal a peu d'effet sur la locomotion.

L'altération du patron locomoteur lors de l'HH est due à la somme des réorganisations et dégradations que l'HH induit sur le système musculaire comme nerveux. L'atrophie musculaire est responsable d'une instabilité posturale qui devra être constamment compensée lors de la marche. De plus, si le système musculaire est moins performant, l'animal ne sera pas capable de lever sa patte aussi haut (flexion lors de la phase de transfert) ou de la projeter aussi loin vers l'avant (protraction) qu'un rat contrôle. Des travaux réalisés au laboratoire suggèrent que lors de l'HH, certains aspects du patron locomoteur sont organisés au niveau supraspinal plutôt que strictement dans la moelle épinière, et que la locomotion est moins dépendante des informations périphériques (Canu et al. 2005). Ainsi, lors de l'HH, la réorganisation des cortex moteur et somesthésique entraîne une désorganisation de la commande motrice initiale et de sa régulation au cours de la marche, et l'IGF-1, en prévenant la réorganisation corticale, peut moduler de façon adéquate le patron locomoteur.

L'administration d'IGF-1 lors d'une période d'hypoactivité a donc pour conséquence un changement dans le fonctionnement du cortex sensorimoteur, qui est corrélé à une amélioration de la performance motrice. On peut légitimement s'interroger sur le lien entre les deux phénomènes, à savoir plasticité corticale et performance motrice. Existe-t-il une relation de cause à effet ? Autrement dit, **la préservation de l'organisation somatotopique est-elle à l'origine de l'amélioration de la performance motrice, ou s'agit-il d'un épiphénomène ?** Savoir si le traitement des informations sensorielles dépend directement des cartes somatotopiques est depuis longtemps sujet à débat (Kaas 1997 ; Weinberg 1997). Penfield, en 1950, décrivait une représentation ordonnée du corps au niveau du cortex. Depuis, notre connaissance sur le sujet s'est accrue et la communauté scientifique a pu constater que cette représentation était plastique autant lors du développement que chez

l'adulte (Buonomano et Merzenich 1998). Désormais, la recherche scientifique explore les mécanismes de cette plasticité et ses fonctions. De nombreuses études et l'avancée des techniques d'imagerie (IRMf) permettent de déterminer, plus spécifiquement, quels sont les facteurs à l'origine cette plasticité cérébrale (changement d'excitabilité, variation des taux de certains neurotransmetteurs...) et de corrélérer ces adaptations à une performance. Par exemple, un changement de l'excitabilité corticale induit par une stimulation transcrânienne répétitive (rTMS) induit une meilleure discrimination tactile (Tegenthoff et al. 2005). Dans le cortex auditif à l'inverse, l'utilisation de microstimulations intracorticales pour induire une réorganisation corticale similaire à celle qui accompagne traditionnellement un apprentissage, n'a pas de conséquence d'un point de vue fonctionnel (discrimination des fréquences...) (Talwar et Gerstein 2001).

Ainsi, si notre connaissance du phénomène s'améliore, les mécanismes liant les réorganisations corticales et leurs influences sur la performance sensorimotrice restent méconnus.

L'hypoactivité a-t-elle des effets inverses à ceux de l'activité physique ?

Dans notre étude sur les liens entre l'IGF-1 et l'hypoactivité, nous nous sommes basés sur les nombreux travaux qui montrent le rôle de l'IGF-1 au centre des effets bénéfiques de l'activité physique. Nous pensions que si les taux de cette substance augmentaient lors de l'activité, il serait logique qu'ils diminuent lors de l'HH. Même si nos études ont confirmé cette hypothèse et montré un effet bénéfique de l'IGF-1, il n'était finalement pas si évident d'avoir ce résultat. En effet, l'HH ne peut être simplement considérée comme l'opposé d'une augmentation d'activité physique.

La comparaison des effets d'une augmentation de l'activité physique et de l'hypodynamie-hypokinésie révèle certaines oppositions. En périphérie tout d'abord, l'activité physique entraîne une hypertrophie musculaire alors qu'une situation d'HH induit une atrophie (Fortney et al. 1996 ; Warburton et al. 2006). Au niveau cérébral ensuite,

l'utilisation répétée d'un membre augmente l'aire de représentation corticale de ce membre (Gindrat et al. 2015), alors qu'une immobilisation la diminue (Lissek et al. 2009).

Néanmoins, les effets de l'activité ne sont pas toujours opposés à ceux de l'HH. Ainsi, au niveau musculaire, l'HH diminue la proportion de fibres lentes et augmente celle de fibres rapides (Brower 2009). En ce qui concerne l'activité, les effets de l'exercice physique varient en fonction du type d'exercice : un entraînement intermittent a pour conséquence, lui aussi, une transition vers des fibres rapides, alors qu'une activité physique de longue durée augmente le nombre de fibres lentes (Wilson et al. 2011). Au niveau cérébral, il est important aussi de préciser le type d'activité. Adkins et collaborateurs (2006) ont montré que les effets pouvaient être très différents selon qu'il s'agit d'un apprentissage moteur, d'un entraînement en force ou en endurance. Il apparaît que l'augmentation de l'aire de représentation corticale d'un membre dépend d'un apprentissage moteur (Kleim et al. 1998 ; Plautz et al. 2000), alors que la répétition d'un mouvement sans apprentissage (Plautz et al. 2000), ou une simple augmentation de l'activité physique (Kleim et al. 2002) n'ont pas d'incidence sur l'organisation de la carte somatotopique. Quant aux champs récepteurs, leurs tailles dépendent du mode de stimulation (tonique vs. phasique) de la patte, et non de la quantité de stimulation. En effet, chez un rat placé en HH par élévation de l'arrière train, on observe un élargissement des champs récepteurs à la fois au niveau des pattes postérieures (qui ne sont plus en contact avec le sol) mais aussi au niveau des pattes antérieures, qui supportent le poids du corps pendant toute la période d'HH (Canu et al. 2007b). Aussi, si au niveau musculaire l'HH entraîne des effets opposés sur les pattes antérieures (en surcharge → hypertrophie) et postérieures (en décharge → atrophie) (Allaf et Goubel, 1999), les effets cérébraux sont plus complexes.

D'un point de vue moléculaire aussi, l'opposition entre hypo- et hyperactivité est loin d'être la règle. L'HH (Dupont et al. 2005) comme l'exercice (Neeper et al. 1996) entraînent une augmentation de l'expression du NGF au niveau cortical. De plus, l'exercice augmente les taux de BDNF (Adlard et al. 2005), alors qu'ils ne sont pas modifiés en HH (Dupont et al. 2005). Enfin, chez l'homme, une hypoactivité a plutôt tendance à diminuer les taux d'IGF-1 (Ferrando et al. 1996), alors que les effets de l'activité physique varient de l'augmentation à la diminution des taux d'IGF-1, selon le type et la quantité d'exercice, le sexe ou l'âge du sujet (pour revue Gatti et al. 2012). Ainsi, ces nombreuses études ont observés des effets

différents selon le type d'exercice physique effectué. **Il conviendrait également de comparer les effets de différents types d'hypoactivité** : élévation de l'arrière-train, immobilisation par plâtrage, voire contention, vol spatial ou même environnement appauvri. Toutefois, les études traitant d'une hypoactivité physique sur le cortex cérébral sont relativement rares. Pourtant, une telle comparaison pourrait être intéressante pour évaluer, chez l'humain, les différences entre une immobilisation, un alitement prolongé, une période de microgravité ou le vieillissement.

Le modèle d'HH reproduit-il ce qui se passe chez l'homme ?

Le modèle de Morey-Holton et Globus (2002) que nous utilisons a été, à l'origine, développé pour mimer les effets de la microgravité. Des effets caractéristiques d'un vol spatial sont observés dans ce modèle, à savoir un transfert des fluides corporels vers la partie thoraco-céphalique du corps et une absence de charge corporelle s'exerçant sur les membres postérieurs (Blomquist et Stone 1983). L'équivalent humain du modèle d'élévation de l'arrière-train que nous utilisons est le « bed-rest », autrement dit l'alitement prolongé. Cette situation entraîne également chez les sujets une sévère réduction de l'activité sensorimotrice, qui se traduit par des altérations musculaires. Elle entraîne également une réorganisation corticale, bien que les travaux dans ce domaine soient plus rares (Roberts et al. 2007, 2010). **Dans une certaine mesure, ce modèle peut rendre compte de ce qui se passe lors du vieillissement** (Vernikos et Schneider 2010). En effet, comme dans notre modèle d'HH, une diminution des taux d'IGF-1 est observée tout au long de la vie de l'individu (pour revue Sonntag et al. 2005). En outre, le vieillissement entraîne, lui aussi, une plasticité corticale : des études menées sur le rat, ont montré que les champs récepteurs sont, comme en HH (Coq et Xerri 1999), élargis chez des rats âgés en comparaison avec des rats adultes (Spengler et al. 1995). Concernant les aires de représentation corticales, une réduction de la carte est observée au niveau du cortex sensoriel comme au niveau du cortex moteur (Spengler et al. 1995 ; Dinse 2006). Ainsi, il apparaît que les effets de l'HH sur cortex sensorimoteur miment bien ceux retrouvés avec le vieillissement. Toutefois, nous pouvons nous questionner sur l'origine de ces altérations liées à l'âge. La réorganisation corticale serait-elle un effet du vieillissement sur le cerveau, comme peut l'être l'apparition favorisée

de maladie neurodégénérative ? Ou est-elle une conséquence de la baisse d'activité physique observée chez les personnes âgées ?

Une différence majeure entre le modèle d'HH et le vieillissement ou l'alitement est que dans notre modèle, l'activité sensorimotrice des membres postérieurs est très fortement limitée. Or, lors d'un alitement prolongé ou du vieillissement, les patients ont, certes, une baisse d'activité sensorimotrice mais bénéficient tout de même de mobilisations passives et on même généralement de séances de kinésithérapie. Or, chez le rat, l'étude de De-Doncker et collaborateurs (2000) a montré qu'une stimulation intermittente, légère et de courte durée (représentant un total de 198 s de stimulation par jour) des mécanorécepteurs cutanés pendant la durée de l'HH prévient partiellement la dégradation du système musculaire induite par l'HH. Bien que cela n'ait pas été étudié, il est possible que cette stimulation ait une incidence sur la réorganisation corticale.

Enfin, toutes nos études ont été réalisées sur des rats soumis à une hypoactivité de 14 jours. Or, Reed et collaborateurs (2011) ont montré qu'il existait une composante temporelle dans la plasticité des cartes corticales. En effet, selon ces auteurs, les réorganisations corticales seraient transitoires et liées à un apprentissage. D'ailleurs, la diminution de surface de l'aire de représentation corticale après 14 jours d'HH est transitoire ; celle-ci revient à la normale après 28 jours d'hypoactivité (Dupont et al. 2011). Chez l'homme, le vieillissement n'est pas limité dans le temps et certaines immobilisations ou alitement peuvent durer bien plus longtemps. Il serait intéressant de déterminer si les effets bénéfiques de l'IGF-1 sur le cortex se poursuivent à plus long terme.

Ainsi, bien que des corrélations existent entre notre modèle animal et les situations humaines d'hypoactivité, aussi bien au niveau musculaire que nerveux, il est important de garder à l'esprit que nos études portent sur un modèle qui présente certaines particularités par rapport aux situations réelles rencontrées chez l'homme.

Plasticité cérébrale, vers une action de la famille des IGFs ?

L'IGF-1 est un facteur de croissance appartenant à la famille de protéines des IGFs comprenant principalement, chez les mammifères, l'IGF-1, l'insuline et l'IGF-2. L'une des caractéristiques des membres de la famille des IGFs est d'avoir une structure très similaire. Dans le cas des molécules d'IGF-1 et d'insuline, elles possèdent chacune des récepteurs auxquels elles se lient avec une forte affinité. Ces récepteurs sont, eux aussi, structurellement très semblables. Cette forte homologie est telle que les sous-unités de ces différents récepteurs peuvent entraîner la formation d'un récepteur hybride IR-IGF-1R. Il a été montré que l'IGF-1 pouvait se lier aux IR et l'insuline aux IGF-1R. En outre, les récepteurs à l'IGF-1, comme ceux à l'insuline, activent préférentiellement la voie de signalisation PI3K-AKT.

Considérant que ces molécules ont des fonctionnements très proches et que nos études ont montré que l'IGF-1 influence la plasticité corticale et la performance motrice, on peut se demander si **l'insuline pourrait également être un médiateur de la plasticité cérébrale**. La présence de récepteur à l'insuline dans le cerveau indique que cet organe est bien soumis aux actions de l'insuline. En effet, plusieurs études ont démontré que l'insuline était capable de moduler la plasticité synaptique (Akintola et van Heemst 2015) en favorisant la croissance axonale, le bourgeonnement dendritique et en modulant la disponibilité des récepteurs aux neurotransmetteurs au niveau de la membrane post-synaptique (Derakhshan et Toth 2013). De plus, l'insuline, comme l'IGF-1, est connue pour avoir des propriétés neuroprotectrices (Tanaka et al. 1995). L'insuline apparaît également comme étant un élément clé dans le comportement alimentaire et divers processus cognitifs comme l'attention, l'apprentissage ou la mémoire (Derakhshan et Toth 2013). Toutefois, l'influence de l'insuline dans la plasticité des cartes corticales n'a, à notre connaissance, jamais été explorée.

Cette question est d'autant plus pertinente que de nombreuses études ont établi des corrélations entre le style de vie sédentaire et le risque de diabésité, situation pathologique regroupant le diabète de type II et l'obésité (Martínez-González et al. 1999 ; Hu 2003 ; Rey-López et al. 2008). De plus, des hauts taux de triglycérides plasmatiques sont capables de limiter l'entrée d'IGF-1 dans le compartiment cérébral par les plexus choroïdes (Dietrich et

al. 2007). Obésité et sédentarité sont les deux principaux facteurs responsables de l'augmentation des triglycérides. Ainsi, l'obésité renforcerait l'effet de l'hypoactivité et/ou de l'âge sur les taux d'IGF-1 cérébraux, et en conséquence sur la performance sensorimotrice.

Par ailleurs, l'insuline est bien connue pour ses fonctions métaboliques. Au niveau cérébral, l'insuline joue un rôle clé dans la régulation du métabolisme énergétique de l'organisme. Une insulino-résistance cérébrale se traduit par une dérégulation de la prise alimentaire qui entraîne une obésité (Klöckener et al. 2011 ; Blázquez et al. 2014). De plus, la liaison de l'insuline à son récepteur entraîne l'activation de neurones hypothalamiques (Spanswick et al. 2000) connus pour être impliqués dans le contrôle de la production de glucose hépatique (Pocai et al. 2005). Considérant que le récepteur à l'IGF-1 est présent dans l'hypothalamus (Fernandez et Torres-Alemán 2012), et que nous avons montré une baisse générale d'activation des récepteurs à l'IGF-1 lors de l'HH, l'HH a-t-elle des conséquences sur l'homéostasie glucidique ?

L'IGF-1 peut-il être pris comme cible thérapeutique ?

Enfin, le but de ces travaux de doctorat étaient d'améliorer nos connaissances sur les réorganisations corticales induites par une période d'HH avec l'objectif, à terme, de développer des stratégies de prévention ou l'amélioration des techniques de récupération fonctionnelle chez des patients alités ou immobilisés. Ainsi, l'IGF-1 pourrait-il être choisi comme cible thérapeutique ? Mes travaux montrent une amélioration de l'activité motrice des rats soumis à l'HH. Bien qu'ils aient été réalisés sur un modèle d'HH qui, par définition, possède ses limites, pourrait-on envisager une utilisation de l'IGF-1 pour améliorer la condition des patients soumis à une période d'HH ? Plusieurs auteurs s'accordent sur le potentiel thérapeutique de l'IGF-1, que cela soit au niveau central pour lutter contre des maladies neurodégénératives (Torres-Aleman 2007) ou au niveau musculaire pour lutter contre l'atrophie liée à l'âge (Grounds 2002). La dégradation de la performance motrice est due à une combinaison de facteurs nerveux comme musculaires (Clark et al. 2006). L'IGF-1 semblerait donc être une cible adéquate. Dans le but de limiter le manque d'IGF-1 cérébral, une administration d'IGF-1 par voie intranasale pourrait être envisagée afin d'augmenter de façon globale les taux d'IGF-1 cérébraux. Cette technique est

déjà appliquée avec de l'insuline pour lutter contre l'insulino-résistance cérébrale observée dans la maladie d'Alzheimer (de la Monte 2013). Toutefois, cette administration, bien que ciblant spécifiquement le cerveau, ne touche pas spécifiquement le cortex sensorimoteur. De plus, elle serait sans effet sur les altérations périphériques notamment musculaires. A l'inverse, l'administration d'IGF-1 par voie sanguine pourrait avoir un effet global sur l'organisme et potentiellement limiter la dégradation musculaire observée lors de l'HH. Toutefois, comme l'entrée d'IGF-1 dans le cerveau se fait spécifiquement au niveau des zones cérébrales activées (Nishijima et al. 2010), une administration périphérique ne permettrait pas d'augmenter le taux d'IGF-1 dans le cortex sensorimoteur. Une solution qui pourrait être apportée serait d'activer le cortex par la technique de stimulation magnétique transcrânienne. Cette technique déjà utilisée dans des protocoles médicaux contre la maladie de Parkinson (Sacco et al. 2011 ; Moisello et al. 2015). Nos travaux ayant montré une amélioration du comportement moteur chez l'animal, cette stimulation non invasive pourrait avoir des effets similaires.

Ainsi, l'ensemble de ces résultats suggère que l'IGF-1 joue un rôle clé dans la réorganisation corticale induite par une réduction de l'activité neuromusculaire. De plus, nos études montrent qu'une prévention, même partielle, de ces adaptations corticales peut induire une amélioration réelle de la performance sensorimotrice. Comme nous venons de l'exposer, l'IGF-1 pourrait, à terme, être considéré comme une cible thérapeutique de choix. Ainsi, bien que ces études restent très fondamentales, elles demandent à être poursuivies pour, potentiellement, aboutir à des études chez l'homme et une application thérapeutique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Åberg ND, Blomstrand F, Åberg MAI, Björklund U, Carlsson B, Carlsson-Skwirut C, et al. Insulin-like growth factor-I increases astrocyte intercellular gap junctional communication and connexin43 expression in vitro. *J. Neurosci. Res.* 2003;74(1):12–22.
- Aberg ND, Brywe KG, Isgaard J. Aspects of growth hormone and insulin-like growth factor-I related to neuroprotection, regeneration, and functional plasticity in the adult brain. *ScientificWorldJournal.* 2006;6:53–80.
- Adams MM, Shi L, Linville MC, Forbes ME, Long AB, Bennett C, et al. Caloric restriction and age affect synaptic proteins in hippocampal CA3 and spatial learning ability. *Exp. Neurol.* 2008;211(1):141–9.
- Adams TE, Epa VC, Garrett TP, Ward CW. Structure and function of the type 1 insulin-like growth factor receptor. *Cell. Mol. Life Sci.* 2000;57(7):1050–93.
- Adkins DL, Boychuk J, Remple MS, Kleim JA. Motor training induces experience-specific patterns of plasticity across motor cortex and spinal cord. *J. Appl. Physiol.* 2006;101(6):1776–82.
- Adlard PA, Perreau VM, Cotman CW. The exercise-induced expression of BDNF within the hippocampus varies across life-span. *Neurobiol. Aging.* 2005 Apr;26(4):511–20.
- Akintola AA., van Heemst D. Insulin, aging, and the brain: mechanisms and implications. *Front. Endocrinol. (Lausanne).* 2015 Feb 6;6(February):13.
- Aleman A, Verhaar HJ, De Haan EH, De Vries WR, Samson MM, Drent ML, et al. Insulin-like growth factor-I and cognitive function in healthy older men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1999;84(2):471–5.
- Aleman A, de Vries WR, Koppeschaar HP, Osman-Dualeh M, Verhaar HJ, Samson MM, et al. Relationship between circulating levels of sex hormones and insulin-like growth factor-1 and fluid intelligence in older men. *Exp. Aging Res.* 2001;27(3):283–91.
- Aleman JA, Nindl BC, Kellogg MD, Tharion WJ, Young AJ, Montain SJ. Effects of dietary protein content on IGF-I, testosterone, and body composition during 8 days of severe energy deficit and arduous physical activity. *J. Appl. Physiol.* 2008;105(May 2008):58–64.
- Allaf O, Goubel F. The rat suspension model is also a good tool for inducing muscle hyperactivity. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol. Arch. Eur. J. Physiol.* 1999 Jan 18;437(3):504–7.

Almeida-Silveira M, Lambertz D, Pérot C, Goubel F. Changes in stiffness induced by hindlimb suspension in rat Achilles tendon. *Eur. J. Appl. Physiol.* 2000;81(3):252–7.

Anderson J, Almeida-Silveira MI, Pérot C. Reflex and muscular adaptations in rat soleus muscle after hindlimb suspension. *J. Exp. Biol.* 1999;202(Pt 19):2701–7.

Armstrong-James M, Fox K, Das-Gupta A. Flow of excitation within rat barrel cortex on striking a single vibrissa. *J. Neurophysiol.* 1992;68(4):1345–58.

Awede B, Thissen JP, Gailly P, Lebacqz J. Regulation of IGF-I, IGFBP-4 and IGFBP-5 gene expression by loading in mouse skeletal muscle. *FEBS Lett.* 1999;461:263–7.

B

Bach LA. IGFBP-6 five years on; not so “forgotten”? *Growth Horm. IGF Res.* 2005. p. 185–92.

Baxter RC. IGF binding proteins in cancer: mechanistic and clinical insights. *Nat. Rev. Cancer.* Nature Publishing Group; 2014;14(5):329–41.

Beck KD, Knusel B, Hefti F. The nature of the trophic action of brain-derived neurotrophic factor, des(1-3)-insulin-like growth factor-1, and basic fibroblast growth factor on mesencephalic dopaminergic neurons developing in culture. *Neuroscience.* 1993;52(4):855–66.

Beck KD, Powell-Braxton L, Widmer HR, Valverde J, Hefti F. IGF1 gene disruption results in reduced brain size, CNS hypomyelination, and loss of hippocampal granule and striatal parvalbumin-containing neurons. *Neuron.* 1995;14:717–30.

Beloozerova IN, Sirota MG. The role of the motor cortex in the control of accuracy of locomotor movements in the cat. *J. Physiol.* 1993;461:1–25.

Beloozerova IN, Sirota MG, Swadlow HA. Activity of different classes of neurons of the motor cortex during locomotion. *J. Neurosci.* 2003;23(3):1087–97.

Berg HE, Dudley GA, Häggmark T, Ohlsén H, Tesch PA. Effects of lower limb unloading on skeletal muscle mass and function in humans. *J. Appl. Physiol.* 1991;70(4):1882–5.

Bernardo KL, McCasland JS, Woolsey TA, Strominger RN. Local intra- and interlaminar connections in mouse barrel cortex. *J. Comp. Neurol.* 1990;291(2):231–55.

Bigbee AJ, Grindeland RE, Roy RR, Zhong H, Gosselink KL, Arnaud S, et al. Basal and evoked levels of bioassayable growth hormone are altered by hindlimb unloading. *J. Appl. Physiol.* 2006;100(December 2005):1037–42.

Blain H, Vuillemin A, Blain A, Jeandel C. The preventive effects of physical activity in the elderly. *Presse Med.* 2000;29(22):1240–8.

- Blair LAC, Marshall J. IGF-1 modulates N and L calcium channels in a PI 3-kinase-dependent manner. *Neuron*. 1997;19:421–9.
- Blázquez E, Velázquez E, Hurtado-Carneiro V, Ruiz-Albusac JM. Insulin in the brain: its pathophysiological implications for States related with central insulin resistance, type 2 diabetes and Alzheimer's disease. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 2014;5(October):161.
- Blomquist CG, Stone HL. Cardiovascular adjustments to gravitational stress. In: Shepard JT, Aboud FM, editors. *Handb. Physiol.* Bethesda: American Physiological Society, Oxford University; 1983. p. 1025–63.
- Bloomberg JJ, Mulavara AP. Changes in Walking Strategies after Spaceflight. *IEEE Eng. Med. Biol. Mag.* 2003. p. 58–62.
- Bolton PS, Tracey DJ. The medullary relay from neck receptors to somatosensory thalamus in the rat: a neuroanatomical study. *Exp. Brain Res.* 1992;88(3):473–84.
- Bondy CA. Transient IGF-I gene expression during the maturation of functionally related central projection neurons. *J. Neurosci.* 1991;11(November):3442–55.
- Bondy C, Werner H, Roberts CT, LeRoith D. Cellular pattern of type-I insulin-like growth factor receptor gene expression during maturation of the rat brain: comparison with insulin-like growth factors I and II. *Neuroscience*. 1992;46(4):909–23.
- Bondy CA, Cheng CM. Signaling by insulin-like growth factor 1 in brain. *Eur. J. Pharmacol.* 2004. p. 25–31.
- Bondy CA, Lee WH. Patterns of insulin-like growth factor and IGF receptor gene expression in the brain. Functional implications. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1993;692:33–43.
- Bouet V, Boulouard M, Toutain J, Divoux D, Bernaudin M, Schumann-Bard P, et al. The adhesive removal test: a sensitive method to assess sensorimotor deficits in mice. *Nat. Protoc.* 2009;4(10):1560–4.
- Bourguignon J, Gérard A. Role of insulin-like growth factor binding proteins in limitation of IGF-I degradation into the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist GPE: evidence from gonadotrophin-releasing hormone secretion in vitro at two developmental stages. *Brain Res.* 1999;847:247–52.
- Bravenboer N, Engelbregt MJT, Visser NA, Popp-Snijders C, Lips P. The effect of exercise on systemic and bone concentrations of growth factors in rats. *J. Orthop. Res.* 2001;19:945–9.
- Brooker GJ, Kalloniatis M, Russo VC, Murphy M, Werther GA, Bartlett PF. Endogenous IGF-1 regulates the neuronal differentiation of adult stem cells. *J. Neurosci. Res.* 2000;59(November 1999):332–41.

- Brösamle C, Schwab ME. Cells of origin, course, and termination patterns of the ventral, uncrossed component of the mature rat corticospinal tract. *J. Comp. Neurol.* 1997;386(2):293–303.
- Brower RG. Consequences of bed rest. *Crit. Care Med.* 2009;37(10):S422–8.
- Brown LT. Projections and termination of the corticospinal tract in rodents. *Exp. Brain Res.* 1971;13(4):432–50.
- Budri M, Lodi E, Franchi G. Sensorimotor restriction affects complex movement topography and reachable space in the rat motor cortex. *Front. Syst. Neurosci.* 2014;8(December):1–17.
- Buonomano DV, Merzenich MM. Cortical plasticity: from synapses to maps. *Annu. Rev. Neurosci.* 1998;21:149–86.
- Büschges A, El Manira A. Sensory pathways and their modulation in the control of locomotion. *Curr. Opin. Neurobiol.* 1998. p. 733–9.
- Byrne A, Byrne DG. The effect of exercise on depression, anxiety and other mood states: a review. *J. Psychosom. Res.* 1993;37:565–74.

C

- Canu MH, Carnaud M, Picquet F, Goutebroze L. Activity-dependent regulation of myelin maintenance in the adult rat. *Brain Res. Elsevier B.V.*; 2009;1252:45–51.
- Canu MH, Darnaudéry M, Falempin M, Maccari S, Viltart O. Effect of hindlimb unloading on motor activity in adult rats: impact of prenatal stress. *Behav. Neurosci.* 2007a;121(1):177–85.
- Canu MH, Falempin M. Effect of hindlimb unloading on locomotor strategy during treadmill locomotion in the rat. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* 1996;78(4):509–15.
- Canu MH, Falempin M. Effect of hindlimb unloading on two hindlimbs muscle during treadmill locomotion in the rat. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* 1997;78(6):509–15.
- Canu MH, Falempin M. Effect of hindlimb unloading on interlimb coordination during treadmill locomotion in the rat. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* 1998;78(6):509–15.
- Canu MH, Falempin M, Orsal D. Fictive motor activity in rat after 14 days of hindlimb unloading. *Exp. Brain Res.* 2001a;139:30–8.

- Canu MH, Garnier C. A 3D analysis of fore- and hindlimb motion during overground and ladder walking: Comparison of control and unloaded rats. *Exp. Neurol.* 2009;218:98–108.
- Canu MH, Garnier C, Lepoutre FX, Falempin M. A 3D analysis of hindlimb motion during treadmill locomotion in rats after a 14-day episode of simulated microgravity. *Behav. Brain Res.* 2005;157:309–21.
- Canu MH, Langlet C, Dupont E, Falempin M. Effects of hypodynamia-hypokinesia on somatosensory evoked potentials in the rat. *Brain Res.* 2003;978:162–8.
- Canu MH, Picquet F, Bastide B, Falempin M. Activity-dependent changes in the electrophysiological properties of regular spiking neurons in the sensorimotor cortex of the rat in vitro. *Behav. Brain Res.* Elsevier B.V.; 2010;209(2):289–94.
- Canu MH, Stevens L, Falempin M. Effect of hindlimb suspension on activation and MHC content of triceps brachii and on the representation of forepaw on the sensorimotor cortex. *Exp. Neurol.* 2007b;203:521–30.
- Canu MH, Stevens L, Ricart-Firinga C, Picquet F, Falempin M. Effect of the β 2-agonist clenbuterol on the locomotor activity of rat submitted to a 14-day period of hypodynamia-hypokinesia. *Behav. Brain Res.* 2001b;122(1):103–12.
- Canu MH, Treffort N, Picquet F, Dubreucq G, Guerardel Y, Falempin M. Concentration of amino acid neurotransmitters in the somatosensory cortex of the rat after surgical or functional deafferentation. *Exp. Brain Res.* 2006;173:623–8.
- Cao P, Maximov A, Südhof TC. Activity-dependent IGF-1 exocytosis is controlled by the Ca²⁺-sensor synaptotagmin-10. *Cell.* 2011;145(2):300–11.
- Carro E, Nuñez A, Busiguina S, Torres-Aleman I. Circulating insulin-like growth factor I mediates effects of exercise on the brain. *J. Neurosci.* 2000;20(8):2926–33.
- Carro E, Spuch C, Trejo JL, Antequera D, Torres-Aleman I. Choroid plexus megalin is involved in neuroprotection by serum insulin-like growth factor I. *J. Neurosci.* 2005;25(47):10884–93.
- Carro E, Trejo JL, Gomez-Isla T, LeRoith D, Torres-Aleman I. Serum insulin-like growth factor I regulates brain amyloid-beta levels. *Nat. Med.* 2002;8(12):1390–7.
- Caselli RJ. Ventrolateral and dorsomedial somatosensory association cortex damage produces distinct somesthetic syndromes in humans. *Neurology.* 1993;43(4):762–71.
- Chen MJ, Russo-Neustadt AA. Running exercise- and antidepressant-induced increases in growth and survival-associated signaling molecules are IGF-dependent. *Growth Factors.* 2007;25(April):118–31.

- Cheng CM, Cohen M, Tseng V, Bondy CA. Endogenous IGF1 enhances cell survival in the postnatal dentate gyrus. *J. Neurosci. Res.* 2001;64:341–7.
- Chernausk SD. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) production by astroglial cells: Regulation and importance for epidermal growth factor-induced cell replication. *J. Neurosci. Res.* 1993;34(2):189–97.
- Chicharro JL, López-Calderon A, Hoyos J, Martín-Velasco AI, Villa G, Villanúa MA, et al. Effects of an endurance cycling competition on resting serum insulin-like growth factor I (IGF-I) and its binding proteins IGFBP-1 and IGFBP-3. *Br. J. Sports Med.* 2001;35:303–7.
- Chmielowska J, Carvell GE, Simons DJ. Spatial organization of thalamocortical and corticothalamic projection systems in the rat Sml barrel cortex. *J. Comp. Neurol.* 1989;285(3):325–38.
- Clark BC, Mahato NK, Nakazawa M, Law TD, Thomas JS. The power of the mind: the cortex as a critical determinant of muscle strength/weakness. *J. Neurophysiol.* 2014;112(12):3219–26.
- Clark BC, Manini TM, Bolanowski SJ, Ploutz-Snyder LL. Adaptations in human neuromuscular function following prolonged unweighting: II. Neurological properties and motor imagery efficacy. *J. Appl. Physiol.* 2006;101:264–72.
- Cohen HS, Kimball KT, Mulavara AP, Bloomberg JJ, Paloski WH. Posturography and locomotor tests of dynamic balance after long-duration spaceflight. *J. Vestib. Res. Equilib. Orientat.* 2012;22(4):191–6.
- Colechio EM, Alloway KD. Differential topography of the bilateral cortical projections to the whisker and forepaw regions in rat motor cortex. *Brain Struct. Funct.* 2009;213(4-5):423–39.
- Coq JO, Xerri C. Tactile impoverishment and sensorimotor restriction deteriorate the forepaw cutaneous map in the primary somatosensory cortex of adult rats. *Exp. Brain Res.* 1999;129(4):518–31.
- Cormery B, Beaumont E, Csukly K, Gardiner P. Hindlimb unweighting for 2 weeks alters physiological properties of rat hindlimb motoneurons. *J. Physiol.* 2005;568(Pt 3):841–50.
- Cotman CW, Berchtold NC. Exercise: A behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends Neurosci.* 2002. p. 295–301.

D

- D'Amelio F, Fox RA, Wu LC, Daunton NG. Quantitative changes of GABA-immunoreactive cells in the hindlimb representation of the rat somatosensory cortex after 14-day hindlimb unloading by tail suspension. *J. Neurosci. Res.* 1996;44(6):532–9.
- D'Ercole a J, Dai Z, Xing Y, Boney C, Wilkie MB, Lauder JM, et al. Brain growth retardation due to the expression of human insulin like growth factor binding protein-1 in transgenic mice: an in vivo model for the analysis of igf function in the brain. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 1994;82:213–22.
- Dall R, Lange KH, Kjaer M, Jørgensen JO, Christiansen JS, Orskov H, et al. No evidence of insulin-like growth factor-binding protein 3 proteolysis during a maximal exercise test in elite athletes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2001;86(2):669–74.
- Daughaday WH, Hall K, Raben MS, Salmon WD, van den Brande JL, van Wyk JJ. Somatomedin: proposed designation for sulphation factor. *Nature.* 1972;235(5333):107.
- De la Monte SM. Intranasal insulin therapy for cognitive impairment and neurodegeneration: current state of the art. *Expert Opin. Drug Deliv.* 2013;10(12):1699–709.
- De-Doncker L, Kasri M, Falempin M. Soleus motoneuron excitability after rat hindlimb unloading using histology and a new electrophysiological approach to record a neurographic analogue of the H-reflex. *Exp. Neurol.* 2006;201(2):368–74.
- De-Doncker L, Picquet F, Browne GB, Falempin M. Expression of myosin heavy chain isoforms along intrafusal fibers of rat soleus muscle spindles after 14 days of hindlimb unloading. *J. Histochem. Cytochem.* 2002;50(11):1543–54.
- De-Doncker L, Picquet F, Falempin M. Effects of cutaneous receptor stimulation on muscular atrophy developed in hindlimb unloading condition. *J. Appl. Physiol.* 2000;89(6):2344–51.
- De-Doncker L, Picquet F, Petit J, Falempin M. Effects of hypodynamia-hypokinesia on the muscle spindle discharges of rat soleus muscle. *J. Neurophysiol.* 2003;89(6):3000–7.
- Dehail P, Duclos C, Barat M. Electrical stimulation and muscle strengthening. *Ann. Readapt. Med. Phys.* 2008. p. 441–51.
- Deijen JB, De Boer H, Van Der Veen EA. Cognitive changes during growth hormone replacement in adult men. *Psychoneuroendocrinology.* 1998;23(1):45–55.
- Derakhshan F, Toth C. Insulin and the brain. *Curr. Diabetes Rev.* 2013;9(2):102–16.

- Desplanches D, Mayet MH, Sempore B, Flandrois R. Structural and functional responses to prolonged hindlimb suspension in rat muscle. *J. Appl. Physiol.* 1987;63(2):558–63.
- DiCicco-Bloom E, Black IB. Insulin growth factors regulate the mitotic cycle in cultured rat sympathetic neuroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1988;85(June):4066–70.
- Dietrich MO, Muller A, Bolos M, Carro E, Perry ML, Portela L V., et al. Western style diet impairs entrance of blood-borne insulin-like growth factor-1 into the brain. *NeuroMolecular Med.* 2007;9(4):324–30.
- Ding Q, Vaynman S, Akhavan M, Ying Z, Gomez-Pinilla F. Insulin-like growth factor I interfaces with brain-derived neurotrophic factor-mediated synaptic plasticity to modulate aspects of exercise-induced cognitive function. *Neuroscience.* 2006;140:823–33.
- Dinse HR. Cortical reorganization in the aging brain. *Prog. Brain Res.* 2006;157(FEBRUARY 2006):57–80.
- Drakenberg K, Ostenson CG, Sara V. Circulating forms and biological activity of intact and truncated insulin-like growth factor I in adult and neonatal rats. *Acta Endocrinol. (Copenh).* 1990;123(1):43–50.
- Duan C, Clemmons DR. Differential expression and biological effects of insulin-like growth factor-binding protein-4 and -5 in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 1998;273:16836–42.
- Duchateau J. Bed rest induces neural and contractile adaptations in triceps surae. *Med. Sci. Sports Exerc.* 1995;27(12):1581–9.
- Dulak NC, Temin HM. A partially purified polypeptide fraction from rat liver cell conditioned medium with multiplication-stimulating activity for embryo fibroblasts. *J. Cell. Physiol.* 1973;81(2):153–60.
- Dupont E, Canu MH, Falempin M. Atropine prevents the changes in the hindlimb cortical area induced by hypodynamia-hypokinesia. *Brain Res.* 2002;926:51–7.
- Dupont E, Canu MH, Falempin M. A 14-day period of hindpaw sensory deprivation enhances the responsiveness of rat cortical neurons. *Neuroscience.* 2003;121:433–9.
- Dupont E, Canu MH, Langlet C, Falempin M. Time course of recovery of the somatosensory map following hindpaw sensory deprivation in the rat. *Neurosci. Lett.* 2001;309:121–4.
- Dupont E, Canu MH, Stevens L, Falempin M. Effects of a 14-day period of hindpaw sensory restriction on mRNA and protein levels of NGF and BDNF in the hindpaw primary somatosensory cortex. *Mol. Brain Res.* 2005;133:78–86.

Dupont E, Stevens L, Cochon L, Falempin M, Bastide B, Canu MH. Erk is involved in the reorganization of somatosensory cortical maps in adult rats submitted to hindlimb unloading. *PLoS One*. 2011;6(3).

Duron E, Funalot B, Brunel N, Coste J, Quinquis L, Viollet C, et al. Insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-3 in Alzheimer's disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2012;97(February):4673–81.

E

Ebert AD, Beres AJ, Barber AE, Svendsen CN. Human neural progenitor cells over-expressing IGF-1 protect dopamine neurons and restore function in a rat model of Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* 2008;209(1):213–23.

Edgerton V, Zhou M, Ohira Y, Klitgaard H, Jiang B, Bell G, et al. Human fiber size and enzymatic properties after 5 and 11 days of spaceflight. *J. Appl. Physiol.* 1995;78(5):1733–9.

Eliakim A, Moromisato M, Moromisato D, Brasel JA, Roberts C, Cooper DM. Increase in muscle IGF-I protein but not IGF-I mRNA after 5 days of endurance training in young rats. *Am. J. Physiol.* 1997;273:R1557–61.

English KL, Paddon-jones D. Protecting muscle mass and function in older adults during bed rest. *Curr. Opin. Nutr. Metab. Care.* 2010;13(1):34–9.

F

Fabri M, Burton H. Topography of connections between primary somatosensory cortex and posterior complex in rat: A multiple fluorescent tracer study. *Brain Res.* 1991;538(2):351–7.

Facchini S, Romani M, Tinazzi M, Aglioti SM. Time-related changes of excitability of the human motor system contingent upon immobilisation of the ring and little fingers. *Clin. Neurophysiol.* 2002;113(3):367–75.

Feldmeyer D, Sakmann B. Synaptic efficacy and reliability of excitatory connections between the principal neurones of the input (layer 4) and output layer (layer 5) of the neocortex. *J. Physiol.* 2000;525 Pt 1(October 1999):31–9.

Fernandez AM, Torres-Alemán I. The many faces of insulin-like peptide signalling in the brain. *Nat. Rev. Neurosci.* Nature Publishing Group; 2012. p. 225–39.

Ferrando AA, Lane HW, Stuart CA, Davis-Street J, Wolfe RR. Prolonged bed rest decreases skeletal muscle and whole body protein synthesis. *Am. J. Physiol.* 1996;270(2):E627–33.

Firth SM, Baxter RC. Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins. *Endocr. Rev.* 2002. p. 824–54.

Fitts RH, Riley DR, Widrick JJ. Physiology of a microgravity environment invited review: microgravity and skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 2000;89(2):823–39.

Florini JR, Harned JA, Richman RA, Weiss JP. Effect of rat age on serum levels of growth hormone and somatomedins. *Mech. Ageing Dev.* 1981;15:165–76.

Fortney SM, Schneider VS, Greenleaf JE. The physiology of bed rest. *Suppl. 14 Handb. Physiol. Environ. Physiol.* 1996.

Froech ER, Buergi H, Ramseier EB, Bally P, Labhart A. Antibody-suppressible and nonsuppressible insulin-like activities in human serum and their physiologic significance. An insulin assay with adipose tissue of increased precision and specificity. *J. Clin. Invest.* 1963;42(11):1816–34.

G

Gandevia SC. Spinal and supraspinal factors in human muscle fatigue. *Physiol. Rev.* 2001;81(4):1725–89.

Garcia J, Ahmadi A, Wonnacott A, Sutcliffe W, Nagga K, Soderkvist P, et al. Association of insulin-like growth factor-1 receptor polymorphism in dementia. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 2006;22:439–44.

Garnier C, Falempin M, Canu M-H. A 3D analysis of fore- and hindlimb motion during locomotion: comparison of overground and ladder walking in rats. *Behav. Brain Res. Brain Res.* 2008;186(1):57–65.

Gatti R, De Palo EF, Antonelli G, Spinella P. IGF-I/IGFBP system: metabolism outline and physical exercise. *J. Endocrinol. Invest.* 2012;35:699–707.

Giesler GJ, Nahin RL, Madsen AM. Postsynaptic dorsal column pathway of the rat. I. Anatomical studies. *J. Neurophysiol.* 1984;51(2):260–75.

Gillis GB, Biewener AA. Hindlimb muscle function in relation to speed and gait: in vivo patterns of strain and activation in a hip and knee extensor of the rat (*Rattus norvegicus*). *J. Exp. Biol.* 2001;204(Pt 15):2717–31.

- Gindrat A, Chytiris M, Balerna M, Rouiller EM, Ghosh A. Report Use-Dependent Cortical Processing from Fingertips in Touchscreen Phone Users. *Curr. Biol.* Elsevier Ltd; 2015;25(1):109–16.
- Gomes RJ, de Mello MAR, Caetano FH, Sibuya CY, Anaruma CA., Rogatto GP, et al. Effects of swimming training on bone mass and the GH/IGF-1 axis in diabetic rats. *Growth Horm. IGF Res.* 2006;16:326–31.
- Gómez-Pinilla F, Ying Z, Opazo P, Roy RR, Edgerton VR. Differential regulation by exercise of BDNF and NT-3 in rat spinal cord and skeletal muscle. *Eur. J. Neurosci.* 2001;13:1078–84.
- Gonzalez de la Vega A, Buño W, Pons S, Garcia-Calderat MS, Garcia-Galloway E, Torres-Aleman I. Insulin-like growth factor I potentiates kainate receptors through a phosphatidylinositol 3-kinase dependent pathway. *Neuroreport.* 2001;12(6):1293–6.
- Górska T, Zmysłowski W, Majczyński H. Overground locomotion in intact rats: Interlimb coordination, support patterns and support phases duration. *Acta Neurobiol. Exp. (Wars).* 1999;59(2):131–44.
- Greene E. *Anatomy of the rat.* Hafner Pub. Co.; 1963.
- Grigg P. Stretch sensitivity of mechanoreceptor neurons in rat hairy skin. *J. Neurophysiol.* 1996;76(5):2886–95.
- Grounds MD. Reasons for the degeneration of ageing skeletal muscle: A central role for IGF-1 signalling. *Biogerontology.* 2002;3(1-2):19–24.
- Guan J. Insulin-like growth factor -1 (IGF-1) derived neuropeptides, a novel strategy for the development of pharmaceuticals for managing ischemic brain injury. *CNS Neurosci. Ther.* 2011. p. 250–5.
- Guan J, Waldvogel HJ, Faull RL, Gluckman PD, Williams CE. The effects of the N-terminal tripeptide of insulin-like growth factor-1, glycine-proline-glutamate in different regions following hypoxic-ischemic brain injury in adult rats. *Neuroscience.* 1999;89(3):649–59.
- Gutiérrez-Ospina G, Calikoglu AS, Ye P, D’Ercole AJ. In vivo effects of insulin-like growth factor-I on the development of sensory pathways: Analysis of the primary somatic sensory cortex (S1) of transgenic mice. *Endocrinology.* 1996;137(12):5484–92.

H

- Halassa MM, Fellin T, Haydon PG. The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. *Trends Mol. Med.* 2007 Feb;13(2):54–63.

- Hamann W. Mammalian cutaneous mechanoreceptors. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 1995. p. 81–104.
- Henneman E. Relation between size of neurons and their susceptibility to discharge. *Science.* 1957;126(3287):1345–7.
- Hodge RD, D’Ercole AJ, O’Kusky JR. Increased expression of insulin-like growth factor-I (IGF-I) during embryonic development produces neocortical overgrowth with differentially greater effects on specific cytoarchitectonic areas and cortical layers. *Dev. Brain Res.* 2005;154:227–37.
- Höflich A, Lahm H, Blum W, Kolb H, Wolf E. Insulin-like growth factor-binding protein-2 inhibits proliferation of human embryonic kidney fibroblasts and of IGF-responsive colon carcinoma cell lines. *FEBS Lett.* 1998;434:329–34.
- Homick JL, Reschke MF. Postural equilibrium following exposure to weightless space flight. *Acta Otolaryngol.* 1977;83(5-6):45 5–64.
- Hosp JA, Molina-Luna K, Hertler B, Atiemo CO, Luft AR. Dopaminergic Modulation of Motor Maps in Rat Motor Cortex: An In Vivo Study. *Neuroscience. IBRO;* 2009;159(2):692–700.
- Houades V, Koulakoff A, Ezan P, Seif I, Giaume C. Gap Junction-Mediated Astrocytic Networks in the Mouse Barrel Cortex. *J. Neurosci.* 2008 May 14;28(20):5207–17.
- Hu FB. Sedentary lifestyle and risk of obesity and type 2 diabetes. *Lipids.* 2003. p. 103–8.
- Huber R, Ghilardi MF, Massimini M, Ferrarelli F, Riedner BA, Peterson MJ, et al. Arm immobilization causes cortical plastic changes and locally decreases sleep slow wave activity. *Nat. Neurosci.* 2006;9(9):1169–76.
- Hunt CC. Mammalian muscle spindle: peripheral mechanisms. *Physiol. Rev.* 1990;70(3):643–63.
- Hurtado-Chong A, Yusta-Boyo MJ, Vergaño-Vera E, Bulfone A, De Pablo F, Vicario-Abejón C. IGF-I promotes neuronal migration and positioning in the olfactory bulb and the exit of neuroblasts from the subventricular zone. *Eur. J. Neurosci.* 2009;30(June):742–55.
- |
- Ikeda T, Waldbillig RJ, Puro DG. Truncation of IGF-I yields two mitogens for retinal Müller glial cells. *Brain Res.* 1995;686:87–92.

Ishihara A, Ohira Y, Roy RR, Nagaoka S, Sekiguchi C, Hinds WE, et al. Effects of 14 days of spaceflight and nine days of recovery on cell body size and succinate dehydrogenase activity of rat dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience*. 1997;81(1):275–9.

J

Jami L. Golgi tendon organs in mammalian skeletal muscle: functional properties and central actions. *Physiol. Rev.* 1992;72(3):623–66.

Jones DM, Tucker BA, Rahimtula M, Mearow KM. The synergistic effects of NGF and IGF-1 on neurite growth in adult sensory neurons: convergence on the PI 3-kinase signaling pathway. *J. Neurochem.* 2003;86:1116–28.

Jones EG. Lamination and differential distribution of thalamic afferents within the sensory-motor cortex of the squirrel monkey. *J. Comp. Neurol.* 1975;160(2):167–203.

Jones JI, Busby WH, Wright G, Smith CE, Kimack NM, Clemmons DR. Identification of the sites of phosphorylation in insulin-like growth factor binding protein-1: Regulation of its affinity by phosphorylation of serine 101. *J. Biol. Chem.* 1993;268(2):1125–31.

Jones JI, Clemmons DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins: Biological actions. *Endocr. Rev.* 1995. p. 3–34.

Joosten EAJ, Schuitman RL, Vermelis MEJ, Dederen PJWC. Postnatal development of the ipsilateral corticospinal component in rat spinal cord: A light and electron microscopic anterograde HRP study. *J. Comp. Neurol.* 1992;326(1):133–46.

Jozsa L, Thöring J, Järvinen M, Kannus P, Lehto M, Kvist M. Quantitative alterations in intramuscular connective tissue following immobilization: an experimental study in the rat calf muscles. *Exp. Mol. Pathol.* 1988;49(2):267–78.

Juul A, Dalgaard P, Blum WF, Bang P, Hall K, Michaelsen KF, et al. Serum levels of insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 (IGFBP-3) in healthy infants, children, and adolescents: The relation to IGF-I, IGF-II, IGFBP-1, IGFBP-2, age, sex, body mass index, and pubertal maturation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1995;80(8):2534–42.

K

Kaas JH. Topographic maps are fundamental to sensory processing. *Brain Res. Bull.* 1997. p. 107–12.

Kanaley JA., Frystyk J, Møller N, Dall R, Chen JW, Nielsen SC, et al. The effect of submaximal exercise on immuno- and bioassayable IGF-I activity in patients with GH-deficiency and healthy subjects. *Growth Horm. IGF Res.* 2005;15:283–90.

- Kaneko F, Murakami T, Onari K, Kurumadani H, Kawaguchi K. Decreased cortical excitability during motor imagery after disuse of an upper limb in humans. *Clin. Neurophysiol.* 2003;114(12):2397–403.
- Kanety H, Karasik A, Klinger B, Silbergeld A, Laron Z. Long-term treatment of Laron type dwarfs with insulin-like growth factor-1 increases serum insulin-like growth factor-binding protein-3 in the absence of growth hormone activity. *Acta Endocrinol. (Copenh).* 1993;128(2):144–9.
- Kappeler L, De Magalhaes Filho C, Dupont J, Leneuve P, Cervera P, Périn L, et al. Brain IGF-1 receptors control mammalian growth and lifespan through a neuroendocrine mechanism. *PLoS Biol.* 2008;6(10):2144–53.
- Kar S, Chabot JG, Quirion R. Quantitative autoradiographic localization of [125I]insulin-like growth factor I, [125I]insulin-like growth factor II, and [125I]insulin receptor binding sites in developing and adult rat brain. *J. Comp. Neurol.* 1993;333:375–97.
- Karni A, Meyer G, Jezard P, Adams MM, Turner R, Ungerleider LG. Functional MRI evidence for adult motor cortex plasticity during motor skill learning. *Nature.* 1995;377(6545):155–8.
- Kawakami Y, Akima H, Kubo K, Muraoka Y, Hasegawa H, Kouzaki M, et al. Changes in muscle size, architecture, and neural activation after 20 days of bed rest with and without resistance exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.* 2001;84(1-2):7–12.
- Keyvani K, Witte OW, Reinecke S, Paulus W. Use-related gene expression patterns of rat motor cortex. *Neuroreport.* 2002;13(7):953–6.
- Kleim JA, Barbay S, Nudo RJ. Functional reorganization of the rat motor cortex following motor skill learning. *J. Neurophysiol.* 1998;80(6):3321–5.
- Kleim JA, Cooper NR, VandenBerg PM. Exercise induces angiogenesis but does not alter movement representations within rat motor cortex. *Brain Res.* 2002;934(1):1–6.
- Klößener T, Hess S, Belgardt BF, Paeger L, Verhagen LAW, Husch A, et al. High-fat feeding promotes obesity via insulin receptor/PI3K-dependent inhibition of SF-1 VMH neurons. *Nat. Neurosci.* 2011;14(7):911–8.
- Koukourikos K, Tsaloglidou A, Kourkouta L. Muscle atrophy in intensive care unit patients. *Acta Inform. Med.* 2014;22(6):406–10.
- Kozlovskaya IB, Kreidich Y V., Oganov VS, Koserenko OP. Pathophysiology of motor functions in prolonged manned space flights. *Acta Astronaut.* 1981;8(9-10):1059–72.
- Krasnov IB. Gravitational Neuromorphology. *Adv. Space Biol. Med.* 1994;4(C):85–110.

Küchler M, Fouad K, Weinmann O, Schwab ME, Raineteau O. Red nucleus projections to distinct motor neuron pools in the rat spinal cord. *J. Comp. Neurol.* 2002;448(4):349–59.

L

Langer N, Hänggi J, Müller NA., Simmen HP, Jäncke L. Effects of limb immobilization on brain plasticity. *Neurology.* 2012;78(3):182–8.

Langlet C, Bastide B, Canu MH. Hindlimb unloading affects cortical motor maps and decreases corticospinal excitability. *Exp. Neurol.* Elsevier Inc.; 2012;237(1):211–7.

Langlet C, Canu MH, Falempin M. Short-term reorganization of the rat somatosensory cortex following hypodynamia-hypokinesia. *Neurosci. Lett.* 1999;266:145–8.

Langlet C, Canu MH, Viltart O, Sequeira H, Falempin M. Hypodynamia-hypokinesia induced variations in expression of fos protein in structures related to somatosensory system in the rat. *Brain Res.* 2001;905:72–80.

Laurino L, Wang XX, de la Houssaye BA, Sosa L, Dupraz S, Cáceres A, et al. PI3K activation by IGF-1 is essential for the regulation of membrane expansion at the nerve growth cone. *J. Cell Sci.* 2005;118(c):3653–62.

Lawrence DG, Hopkins DA. The development of motor control in the rhesus monkey: evidence concerning the role of corticomotoneuronal connections. *Brain.* 1976;99(2):235–54.

LeBlanc AD, Rowe R, Schneifer V, Evans H, Hedrick T. Regional muscle loss after short duration spaceflight. *Aviat. Sp. Environ. Med.* 1995;66(12):8747608.

Leem JW, Willis WD, Weller SC, Chung JM. Differential activation and classification of cutaneous afferents in the rat. *J. Neurophysiol.* 1993;70(6):2411–24.

Leme JACA, Silveira RF, Gomes RJ, Moura RF, Sibuya CA., Mello MAR, et al. Long-term physical training increases liver IGF-I in diabetic rats. *Growth Horm. IGF Res.* Elsevier Ltd; 2009;19(3):262–6.

Leme JACA, Gomes RJ, de Mello MAR, Luciano E. Effects of short-term physical training on the liver IGF-I in diabetic rats. *Growth Factors.* 2007;25(February):9–14.

Leterme D, Falempin M, Mounier Y. Preliminary results of the influence of direct stimulation on the mechanical properties of the soleus muscle of rats during hindlimb suspension. *Physiologist.* 1991;34(1 Suppl):S179–80.

- Leuner B, Gould E, Shors TJ. Is there a link between adult neurogenesis and learning? *Hippocampus*. 2006. p. 216–24.
- Lewitt MS, Saunders H, Phuyal JL, Baxter RC. Complex formation by human insulin-like growth factor-binding protein-3 and human acid-labile subunit in growth hormone-deficient rats. *Endocrinology*. 1994;134(6):2404–9.
- Li XG, Florence SL, Kaas JH. Areal distributions of cortical neurons projecting to different levels of the caudal brain stem and spinal cord in rats. *Somatosens. Mot. Res.* 1990;7(3):315–35.
- Liepert J, Tegenthoff M, Malin JP. Changes of cortical motor area size during immobilization. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 1995;97(6):382–6.
- Lindgren JU. Studies of the calcium accretion rate of bone during immobilization in intact and thyroparathyroidectomized adult rats. *Calcif. Tissue Res.* 1977;22(1):41–7.
- Lissek S, Wilimzig C, Stude P, Pleger B, Kalisch T, Maier C, et al. Immobilization Impairs Tactile Perception and Shrinks Somatosensory Cortical Maps. *Curr. Biol.* 2009;19(10):837–42.
- Liu W, Sheng H, Xu Y, Liu Y, Lu J, Ni X. Swimming exercise ameliorates depression-like behavior in chronically stressed rats: Relevant to proinflammatory cytokines and IDO activation. *Behav. Brain Res. Elsevier B.V.*; 2013;242:110–6.
- Llorens-Martín M, Torres-Alemán I, Trejo JL. Growth factors as mediators of exercise actions on the brain. *NeuroMolecular Med.* 2008. p. 99–107.
- Llorens-Martín M, Torres-Alemán I, Trejo JL. Exercise modulates insulin-like growth factor 1-dependent and -independent effects on adult hippocampal neurogenesis and behaviour. *Mol. Cell. Neurosci. Elsevier Inc.*; 2010;44(2):109–17.
- López-Hidalgo M, Schummers J. Cortical maps: A role for astrocytes? *Curr. Opin. Neurobiol.* 2014. p. 176–89.
- Lopez-Lopez C, LeRoith D, Torres-Aleman I. Insulin-like growth factor I is required for vessel remodeling in the adult brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2004;101(26):9833–8.
- Lund RD, Webster KE. Thalamic afferents from the dorsal column nuclei. An experimental anatomical study in the rat. *J. Comp. Neurol.* 1967a;130(4):301–12.
- Lund RD, Webster KE. Thalamic afferents from the spinal cord and trigeminal nuclei. An experimental anatomical study in the rat. *J. Comp. Neurol.* 1967b;130(4):313–28.
- Lundbye-Jensen J, Nielsen JB. Central nervous adaptations following 1 wk of wrist and hand immobilization. *J. Appl. Physiol.* 2008;105(1):139–51.

M

- Mader SS. Human Biology. McGraw-Hill, editor. New York; 2007.
- Markowska AL, Mooney M, Sonntag WE. Insulin-like growth factor-1 ameliorates age-related behavioral deficits. *Neuroscience*. 1998;87(3):559–69.
- Martinez M, Brezun JM, Zennou-Azogui Y, Baril N, Xerri C. Sensorimotor training promotes functional recovery and somatosensory cortical map reactivation following cervical spinal cord injury. *Eur. J. Neurosci*. 2009;30(12):2356–67.
- Martínez-González MA, Martínez JA, Hu FB, Gibney MJ, Kearney J. Physical inactivity, sedentary lifestyle and obesity in the European Union. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord*. 1999;23(11):1192–201.
- Matsakas A, Nikolaidis MG, Kokalas N, Mougios V, Diel P. Effect of voluntary exercise on the expression of IGF-I and androgen receptor in three rat skeletal muscles and on serum IGF-I and testosterone levels. *Int. J. Sports Med*. 2004;25:502–8.
- Maya-Vetencourt JF, Baroncelli L, Viegi A, Tiraboschi E, Castren E, Cattaneo A, et al. IGF-1 Restores Visual Cortex Plasticity in Adult Life by Reducing Local GABA Levels. *Neural Plast*. 2012;2012(Vc):1–10.
- McCrea DA. Spinal circuitry of sensorimotor control of locomotion. *J. Physiol*. 2001. p. 41–50.
- Metz GA, Whishaw IQ. Cortical and subcortical lesions impair skilled walking in the ladder rung walking test: A new task to evaluate fore- and hindlimb stepping, placing, and coordination. *J. Neurosci. Methods*. 2002;115:169–79.
- Millard CL, Woolf CJ. Sensory innervation of the hairs of the rat hindlimb: a light microscopic analysis. *J. Comp. Neurol*. 1988;277(2):183–94.
- Milliken GW, Plautz EJ, Nudo RJ. Distal forelimb representations in primary motor cortex are redistributed after forelimb restriction: a longitudinal study in adult squirrel monkeys. *J. Neurophysiol*. 2013;109:1268–82.
- Moisello C, Blanco D, Fontanesi C, Lin J, Biagioni M. TMS enhances retention of a motor skill in Parkinson's Disease. *Press*. 2015;8(2):2015–6.
- Molander C, Xu Q, Grant G. The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the rat. I. The lower thoracic and lumbosacral cord. *J. Comp. Neurol*. 1984;230(1):133–41.
- Molander C, Xu Q, Rivero-Melian C, Grant G. Cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the rat: II. The cervical and upper thoracic cord. *J. Comp. Neurol*. 1989;289(3):375–85.

Morey-Holton ER, Globus RK. Hindlimb unloading rodent model: technical aspects. *J. Appl. Physiol.* 2002;92:1367–77.

Morley JE, Kaiser F, Raum WJ, Perry HM, Flood JF, Jensen J, et al. Potentially predictive and manipulable blood serum correlates of aging in the healthy human male: progressive decreases in bioavailable testosterone, dehydroepiandrosterone sulfate, and the ratio of insulin-like growth factor 1 to growth hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1997;94(July):7537–42.

Muir GD, Whishaw IQ. Red nucleus lesions impair overground locomotion in rats: A kinetic analysis. *Eur. J. Neurosci.* 2000;12(3):1113–22.

Mulavara AP, Feiveson AH, Fiedler J, Cohen H, Peters BT, Miller C, et al. Locomotor function after long-duration space flight: Effects and motor learning during recovery. *Exp. Brain Res.* 2010;202(3):649–59.

Munger BL, Ide C. The structure and function of cutaneous sensory receptors. *Arch. Histol. Cytol.* 1988;51(1):1–34.

Münste TF, Altenmüller E, Jäncke L. The musician's brain as a model of neuroplasticity. *Nat. Rev. Neurosci.* 2002;3(6):473–8.

Musacchia XJ, Deavers DR, Meininger GA, Davis TP. A model for hypokinesia: effects on muscle atrophy in the rat. *J. Appl. Physiol.* 1980;48(3):479–86.

N

Nakao-Hayashi J, Ito H, Kanayasu T, Morita I, Murota S. Stimulatory effects of insulin and insulin-like growth factor I on migration and tube formation by vascular endothelial cells. *Atherosclerosis.* 1992;92:141–9.

Neafsey EJ, Bold EL, Haas G, Hurley-Gius KM, Quirk G, Sievert CF, et al. The organization of the rat motor cortex: a microstimulation mapping study. *Brain Res.* 1986;396(1):77–96.

Neeper SA, Gómez-Pinilla F, Choi J, Cotman CW. Physical activity increases mRNA for brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in rat brain. *Brain Res.* 1996;726:49–56.

Neeper SA, Gomez-Pinilla F, Choi J, Cotman C. Exercise and brain neurotrophins. *Nature.* 1995;373:109.

Nemet D, Oh Y, Kim H-S, Hill M, Cooper DM. Effect of intense exercise on inflammatory cytokines and growth mediators in adolescent boys. *Pediatrics.* 2002;110(4):681–9.

Niblock MM, Brunso-Bechtold JK, Riddle DR. Insulin-like growth factor I stimulates dendritic growth in primary somatosensory cortex. *J. Neurosci.* 2000;20(11):4165–76.

Nicogossian A. 29th Annual Harry G. Armstrong Lecture : the human space enterprise in the 21st. *Aviat Sp. Env. Med.* 1994;65(12):1149–52.

Nieuwenhuys A, Pijpers JR, Oudejans RRD, Bakker FC. The influence of anxiety on visual attention in climbing. *J. Sport Exerc. Psychol.* 2008;30(2):171–85.

Nilsson-Håkansson L, Civalero I, Zhang X, Carlsson-Skwirut C, Sara VR, Nordberg A. Effects of IGF-1, truncated IGF-1 and the tripeptide Gly-Pro-Glu on acetylcholine release from parietal cortex of rat brain. *Neuroreport.* 1993;4(9):1111–4.

Nishijima T, Piriz J, Duflot S, Fernandez AM, Gaitan G, Gomez-Pinedo U, et al. Neuronal Activity Drives Localized Blood-Brain-Barrier Transport of Serum Insulin-like Growth Factor-I into the CNS. *Neuron.* 2010;67:834–46.

Nuñez A, Carro E, Torres-Aleman I. Insulin-like growth factor I modifies electrophysiological properties of rat brain stem neurons. *J. Neurophysiol.* 2003;89(February 2003):3008–17.

O

O’Kusky JR, Ye P, D’Ercole AJ. Insulin-like growth factor-I promotes neurogenesis and synaptogenesis in the hippocampal dentate gyrus during postnatal development. *J. Neurosci.* 2000;20(22):8435–42.

Ocrant I, Fay CT, Parmelee JT. Characterization of insulin-like growth factor binding proteins produced in the rat central nervous system. *Endocrinology.* 1990;127(3):1260–7.

Oishi K, Watatani K, Itoh Y, Okano H, Guillemot F, Nakajima K, et al. Selective induction of neocortical GABAergic neurons by the PDK1-Akt pathway through activation of Mash1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2009;106:13064–9.

P

Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* 2nd ed. Academic Press Inc; 1986.

Perrien DS, Akel NS, Dupont-Versteegden EE, Skinner RA, Siegel ER, Suva LJ, et al. Aging alters the skeletal response to disuse in the rat. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2007;292(October 2006):R988–96.

- Peterkofsky B, Gosiewska A, Wilson S, Kim YR. Phosphorylation of rat insulin-like growth factor binding protein-1 does not affect its biological properties. *Arch. Biochem. Biophys.* 1998;357(1):101–10.
- Peterson BW, Maunz RA., Pitts NG, Mackel RG. Patterns of projection and branching of reticulospinal neurons. *Exp. Brain Res.* 1975;23(4):333–51.
- Plautz EJ, Milliken GW, Nudo RJ. Effects of Repetitive Motor Training on Movement Representations in Adult Squirrel Monkeys: Role of Use versus Learning. *Neurobiol. Learn. Mem.* 2000 Jul;74(1):27–55.
- Pocai A, Lam TKT, Gutierrez-Juarez R, Obici S, Schwartz GJ, Bryan J, et al. Hypothalamic K(ATP) channels control hepatic glucose production. *Nature.* 2005;434(7036):1026–31.
- Pubols BH, Haring JH. The raccoon spinocervical and spinothalamic tracts: A horseradish peroxidase study. *Brain Res. Rev.* 1995. p. 196–208.

R

- Rajaram S, Baylink DJ, Mohan S. Insulin-like growth factor-binding proteins in serum and other biological fluids: Regulation and functions. *Endocr. Rev.* 1997. p. 801–31.
- Reed A, Riley J, Carraway R, Carrasco A, Perez C, Jakkamsetti V, et al. Cortical Map Plasticity Improves Learning but Is Not Necessary for Improved Performance. *Neuron.* Elsevier Inc.; 2011 Apr;70(1):121–31.
- Ren JC, Fan XL, Song XA, Zhao XH, Chen MX, Shi L. Prolonged hindlimb unloading leads to changes in electrophysiological properties of L5 dorsal root ganglion neurons in rats after 14 days. *Muscle and Nerve.* 2012;45(1):65–9.
- Reschke MF, Bloomberg JJ, Paloski WH, Mulavara AP, Feiveson AH, Harm DL. Postural reflexes, balance control, and functional mobility with long-duration head-down bed rest. *Aviat. Sp. Environ. Med.* 2009;80(5 PART 2):45–54.
- Rey-López JP, Vicente-Rodríguez G, Biosca M, Moreno LA. Sedentary behaviour and obesity development in children and adolescents. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 2008. p. 242–51.
- Reynolds TS, Stevenson KR, Wathes DC. Pregnancy-specific alterations in the expression of the insulin-like growth factor system during early placental development in the ewe. *Endocrinology.* 1997;138(3):886–97.
- Ricart-Firinga C, Stevens L, Canu MH, Nemirovskaya TL, Mounier Y. Effects of beta(2)-agonist clenbuterol on biochemical and contractile properties of unloaded soleus fibers of rat. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2000;278(3):C582–8.

- Rinderknecht E, Humbel RE. Amino-terminal sequences of two polypeptides from human serum with nonsuppressible insulin-like and cell-growth-promoting activities: evidence for structural homology with insulin B chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1976;73(12):4379–81.
- Rinderknecht E, Humbel RE. Primary structure of human insulin-like growth factor II. *FEBS Lett.* 1978a;89(2):283–6.
- Rinderknecht E, Humbel RE. The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J. Biol. Chem.* 1978b;253:2769–76.
- Robbins A, Pfaff D, Schwartz-Giblin S. Reticulospinal and reticuloreticular pathways for activating the lumbar back muscles in the rat. *Exp. Brain Res.* 1992. p. 46–58.
- Roberts DR, Ramsey D, Johnson K, Kola J, Ricci R, Hicks C, et al. Cerebral cortex plasticity after 90 days of bed rest: Data from TMS and fMRI. *Aviat. Sp. Environ. Med.* 2010;81(1):30–40.
- Roberts DR, Ricci R, Funke FW, Ramsey P, Kelley W, Carroll JS, et al. Lower limb immobilization is associated with increased corticospinal excitability. *Exp. Brain Res.* 2007;181(2):213–20.
- Roll R, Gilhodes JC, Roll JP, Popov K, Charade O, Gurfinkel V. Proprioceptive information processing in weightlessness. *Exp. Brain Res.* 1998;122(4):393–402.
- Rosant C, Nagel MD, Pérot C. Adaptation of rat soleus muscle spindles after 21 days of hindlimb unloading. *Exp. Neurol.* 2006;200(1):191–9.
- Rosendal L, Langberg H, Flyvbjerg A, Frystyk J, Ørskov H, Kjaer M. Physical capacity influences the response of insulin-like growth factor and its binding proteins to training. *J. Appl. Physiol.* 2002;93(July 2002):1669–75.
- Rosselet C, Zennou-Azogui Y, Xerri C. Nursing-induced somatosensory cortex plasticity: temporally decoupled changes in neuronal receptive field properties are accompanied by modifications in activity-dependent protein expression. *J. Neurosci.* 2006;26(42):10667–76.
- Rotwein P. Structure, evolution, expression and regulation of insulin-like growth factors I and II. *Growth Factors.* 1991;5:3–18.
- Rotwein P, Burgess SK, Milbrandt JD, Krause JE. Differential expression of insulin-like growth factor genes in rat central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1988;85(January):265–9.
- Roupas P, Herington AC. Postreceptor signaling mechanisms for growth hormone. *Trends Endocrinol. Metab.* 1994. p. 154–8.

Rüegg DG, Kakebeeke TH, Studer LM. Activation of muscles and microgravity. *Int. J. Sports Med.* 1997;18 Suppl 4:S329–31.

Russo VC, Bach LA, Fosang AJ, Baker NL, Werther GA. Insulin-like growth factor binding protein-2 binds to cell surface proteoglycans in the rat brain olfactory bulb. *Endocrinology.* 1997;138(11):4858–67.

Russo VC, Gluckman PD, Feldman EL, Werther GA. The insulin-like growth factor system and its pleiotropic functions in brain. *Endocr. Rev.* 2005. p. 916–43.

S

Sacco P, Prior M, Poole H, Nurmikko T. PTMS67 Effects of repetitive transcranial magnetic stimulation on experimental hyperalgesia in healthy subjects. *Clin. Neurophysiol.* 2011. p. S199.

Sala-Catala J, Torrero C, Regalado M, Salas M, Ruiz-Marcos A. Movements restriction and alterations of the number of spines distributed along the apical shafts of layer V pyramids in motor and primary sensory cortices of the peripubertal and adult rat. *Neuroscience.* 2005;133(1):137–45.

Salmon WD, Daughaday WH. A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro. *J. Lab. Clin. Med.* 1957;49(6):825–36.

Sara VR, Carlsson-Skwirut C, Andersson C, Hall E, Sjögren B, Holmgren A, et al. Characterization of somatomedins from human fetal brain: identification of a variant form of insulin-like growth factor I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1986;83(July):4904–7.

Sara VR, Carlsson-Skwirut C, Drakenberg K, Giacobini MB, Håkansson L, Mirmiran M, et al. The biological role of truncated insulin-like growth factor-1 and the tripeptide GPE in the central nervous system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1993;692:183–91.

Saura J, Curatolo L, Williams CE, Gatti S, Benatti L, Peeters C, et al. Neuroprotective effects of Gly-Pro-Glu, the N-terminal tripeptide of IGF-1, in the hippocampus in vitro. *Neuroreport.* 1999;10(1):161–4.

Scheibel ME, Scheibel AB. Terminal axonal patterns in cat spinal cord. II. The dorsal horn. *Brain Res.* 1968;9(285):32–58.

Schwarz AJ, Brasel JA, Hintz RL, Mohan S, Cooper DM. Acute effect of brief low- and high-intensity exercise on circulating insulin-like growth factor (IGF) I, II, and IGF-binding protein-3 and its proteolysis in young healthy men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1996;81:3492–7.

- Singh P, Alex JM, Bast F. Insulin receptor (IR) and insulin-like growth factor receptor 1 (IGF-1R) signaling systems: novel treatment strategies for cancer. *Med. Oncol.* 2014;31:805.
- Smith AD, Zigmond MJ. Can the brain be protected through exercise? Lessons from an animal model of parkinsonism. *Exp. Neurol.* 2003. p. 31–9.
- Smith LE, Shen W, Perruzzi C, Soker S, Kinose F, Xu X, et al. Regulation of vascular endothelial growth factor-dependent retinal neovascularization by insulin-like growth factor-1 receptor. *Nat. Med.* 1999;5(12):1390–5.
- Sonntag WE, Lynch C, Thornton P, Khan A, Bennett S, Ingram R. The effects of growth hormone and IGF-1 deficiency on cerebrovascular and brain ageing. *J. Anat.* 2000;197 Pt 4:575–85.
- Sonntag WE, Lynch CD, Cooney PT, Hutchins PM. Decreases in cerebral microvasculature with age are associated with the decline in growth hormone and insulin-like growth factor 1. *Endocrinology.* 1997;138:3515–20.
- Sonntag WE, Ramsey M, Carter CS. Growth hormone and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and their influence on cognitive aging. *Ageing Res. Rev.* 2005. p. 195–212.
- Spanswick D, Smith MA, Mirshamsi S, Routh VH, Ashford ML. Insulin activates ATP-sensitive K⁺ channels in hypothalamic neurons of lean, but not obese rats. *Nat. Neurosci.* 2000 Aug 1;3(8):757–8.
- Spengler F, Godde B, Dinse HR. Effects of ageing on topographic organization of somatosensory cortex. *Neuroreport.* 1995 Feb;6(3):469–73.
- Stevens L, Mounier Y, Holy X, Falempin M. Contractile properties of rat soleus muscle after 15 days of hindlimb suspension. *J. Appl. Physiol.* 1990;68(1):334–40.
- Stevenson KR, Gilmour RS, Wathes DC. Localization of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and -II messenger ribonucleic acid and type 1 IGF receptors in the ovine uterus during the estrous cycle and early pregnancy. *Endocrinology.* 1994;134(4):1655–64.
- Strasman T, van der Wal JC, Halata Z, Drukker J. Functional topography and ultrastructure of periarticular mechanoreceptors in the lateral elbow region of the rat. *Acta Anat. (Basel).* 1990;138(1):1–14.
- Strollo F, Norsk P, Roecker L, Strollo G, More M, Bollanti L, et al. Indirect evidence of CNS adrenergic pathways activation during spaceflight. *Aviat. Sp. Environ. Med.* 1998;69(8):777–80.
- Stummer W, Weber K, Tranmer B, Baethmann A, Kempfski O. Reduced mortality and brain damage after locomotor activity in gerbil forebrain ischemia. *Stroke.* 1994;25:1862–9.

Su EJ, Cioffi CL, Stefansson S, Mittereder N, Garay M, Hreniuk D, et al. Gene therapy vector-mediated expression of insulin-like growth factors protects cardiomyocytes from apoptosis and enhances neovascularization. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2003;284:H1429–40.

Suliman IA, Lindgren JU, Elhassan AM, Diab KM, Adem A. Effects of short- and long-term rat hind limb immobilization on spinal cord insulin-like growth factor-I and its receptor. *Brain Res.* 2001;912:17–23.

Sung YH, Kim SC, Hong HP, Park CY, Shin MS, Kim CJ, et al. Treadmill exercise ameliorates dopaminergic neuronal loss through suppressing microglial activation in Parkinson's disease mice. *Life Sci. Elsevier Inc.*; 2012. p. 1309–16.

T

Talwar SK, Gerstein GL. Reorganization in awake rat auditory cortex by local microstimulation and its effect on frequency-discrimination behavior. *J. Neurophysiol.* 2001;86(4):1555–72.

Tanaka M, Sawada M, Yoshida S, Hanaoka F, Marunouchi T. Insulin prevents apoptosis of external granular layer neurons in rat cerebellar slice cultures. *Neurosci. Lett.* 1995 Oct;199(1):37–40.

Tegenthoff M, Ragert P, Pleger B, Schwenkreis P, Förster AF, Nicolas V, et al. Improvement of tactile discrimination performance and enlargement of cortical somatosensory maps after 5 Hz rTMS. *PLoS Biol.* 2005;3(11):2031–40.

Templeton GH, Sweeney HL, Timson BF, Padalino M, Dudenhoefter GA. Changes in fiber composition of soleus muscle during rat hindlimb suspension. *J. Appl. Physiol.* 1988;65(3):1191–5.

Tesch PA, Berg HE, Häggmark T, Ohlsén H, Dudley GA. Muscle strength and endurance following lowerlimb suspension in man. *Physiologist.* 1991;34(1 Suppl):S104–6.

Torres-Aleman I. Targeting insulin-like growth factor-1 to treat Alzheimer's disease. *Expert Opin. Ther. Targets.* 2007;11:1535–42.

Torres-Aleman I. Toward a comprehensive neurobiology of IGF-I. *Dev. Neurobiol.* 2010. p. 384–96.

Torres-Aleman I, Naftolin F, Robbins RJ. Trophic effects of basic fibroblast growth factor on fetal rat hypothalamic cells: interactions with insulin-like growth factor I. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 1990;52:253–7.

Treffort N, Dubreucq G, Canu MH, Guérardel Y, Falempin M, Picquet F. Variations in amino acid neurotransmitters in the rat ventral spinal cord after hindlimb unloading. *Neurosci. Lett.* 2006;403:147–50.

Trejo JL, Carro E, Torres-Aleman I. Circulating insulin-like growth factor I mediates exercise-induced increases in the number of new neurons in the adult hippocampus. *J. Neurosci.* 2001;21(5):1628–34.

Trejo JL, Llorens-Martín MV, Torres-Alemán I. The effects of exercise on spatial learning and anxiety-like behavior are mediated by an IGF-I-dependent mechanism related to hippocampal neurogenesis. *Mol. Cell. Neurosci.* 2008;37:402–11.

Trinel D, Picquet F, Bastide B, Canu MH. Dendritic spine remodeling induced by hindlimb unloading in adult rat sensorimotor cortex. *Behav. Brain Res. Elsevier B.V.*; 2013;249:1–7.

Tu H, Xu C, Zhang W, Liu Q, Rondard P, Pin J-P, et al. GABAB receptor activation protects neurons from apoptosis via IGF-1 receptor transactivation. *J. Neurosci.* 2010;30(2):749–59.

V

Van Praag H, Christie BR, Sejnowski TJ, Gage FH. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1999;96(23):13427–31.

Vernikos J, Schneider VS. Space, gravity and the physiology of aging: Parallel or convergent disciplines? A mini-review. *Gerontology.* 2010. p. 157–66.

Viaro R, Budri M, Parmiani P, Franchi G. Adaptive changes in the motor cortex during and after longterm forelimb immobilization in adult rats. *J. Physiol.* 2014;592:2137–52.

W

Wall JT, Cusick CG. Cutaneous responsiveness in primary somatosensory (S-I) hindpaw cortex before and after partial hindpaw deafferentation in adult rats. *J. Neurosci.* 1984;4:1499–515.

Wallace JD, Cuneo RC, Baxter R, Ørskov H, Keay N, Pentecost C, et al. Responses of the growth hormone (GH) and insulin-like growth factor axis to exercise, GH administration, and GH withdrawal in trained adult males: A potential test for GH abuse in sport. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1999;84(10):3591–601.

- Wang YT, Linden DJ. Expression of cerebellar long-term depression requires postsynaptic clathrin-mediated endocytosis. *Neuron*. 2000;25:635–47.
- Warburton DER, Nicol CW, Bredin SSD. Health benefits of physical activity: the evidence. *CMAJ*. 2006 Mar 14;174(6):801–9.
- Watanabe T, Miyazaki A, Katagiri T, Yamamoto H, Idei T, Iguchi T. Relationship between serum insulin-like growth factor-1 levels and Alzheimer's disease and vascular dementia. *J. Am. Geriatr. Soc.* 2005;53:1748–53.
- Watson AJ, Watson PH, Arcellana-Panlilio M, Warnes D, Walker SK, Schultz G a, et al. A growth factor phenotype map for ovine preimplantation development. *Biol. Reprod.* 1994;50:725–33.
- Weibull A, Flondell M, Rosén B, Björkman A. Cerebral and clinical effects of short-term hand immobilisation. *Eur. J. Neurosci.* 2011;33(4):699–704.
- Weiler N, Wood L, Yu J, Solla SA, Shepherd GMG. Top-down laminar organization of the excitatory network in motor cortex. *Nat. Neurosci.* 2008;11(3):360–6.
- Weinberg R. Are Topographic Maps Fundamental to Sensory Processing? *Brain Res. Bull.* 1997. p. 107–12.
- Weiss DS, Keller A. Specific patterns of intrinsic connections between representation zones in the rat motor cortex. *Cereb. Cortex.* 1994;4(2):205–14.
- Werner H, Weinstein D, Bentov I. Similarities and differences between insulin and IGF-I: structures, receptors, and signalling pathways. *Arch. Physiol. Biochem.* 2008;114(January):17–22.
- Werther GA, Abate M, Hogg A, Cheesman H, Oldfield B, Hards D, et al. Localization of insulin-like growth factor-I mRNA in rat brain by in situ hybridization--relationship to IGF-I receptors. *Mol. Endocrinol.* 1990;4(5):773–8.
- Whishaw IQ, Gorny B, Sarna J. Paw and limb use in skilled and spontaneous reaching after pyramidal tract, red nucleus and combined lesions in the rat: Behavioral and anatomical dissociations. *Behav. Brain Res.* 1998;93(1-2):167–83.
- Whishaw IQ, O'Connor WT, Dunnett SB. The contributions of motor cortex, nigrostriatal dopamine and caudate-putamen to skilled forelimb use in the rat. *Brain.* 1986;109 (Pt 5):805–43.
- Widrick JJ, Knuth ST, Norenberg KM, Romatowski JG, Bain JLW, Riley DA., et al. Effect of a 17 day spaceflight on contractile properties of human soleus muscle fibres. *J. Physiol.* 1999;516(3):915–30.

Wiggs MP. Can endurance exercise preconditioning prevention disuse muscle atrophy? *Front. Physiol.* 2015;6(March):1–13.

Wilson JM, Loenneke JP, Jo E, Wilson GJ, Zourdos MC, Kim J-S. The Effects of Endurance, Strength, and Power Training on Muscle Fiber Type Shifting. *J. Strength Cond. Res.* 2011 Sep;(SEPTEMBER):1.

Wolfe RR. The underappreciated role of muscle in health and disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 2006. p. 475–82.

Wood TL, Brown AL, Rechler MM, Pintar JE. The expression pattern of an insulin-like growth factor (IGF)-binding protein gene is distinct from IGF-II in the midgestational rat embryo. *Mol. Endocrinol.* 1990;4(8):1257–63.

X

Xing C, Yin Y, Chang R, Gong X, He X, Xie Z. Effects of insulin-like growth factor 1 on synaptic excitability in cultured rat hippocampal neurons. *Exp. Neurol.* 2007;205:222–9.

Xu X, Sonntag WE. Growth hormone and aging: Regulation, signal transduction and replacement therapy. *Trends Endocrinol. Metab.* 1996. p. 145–50.

Y

Yamamoto H, Murphy LJ. Enzymatic conversion of IGF-I to des(1-3)IGF-I in rat serum and tissues: A further potential site of growth hormone regulation of IGF-I action. *J. Endocrinol.* 1995;146(1):141–8.

Yamanaka K, Yamamoto S, Nakazawa K, Yano H, Suzuki Y, Fukunaga T. Effects of long-term bed rest on H-reflex and motor evoked potential in lower leg muscles during standing. *J. Gravit. Physiol.* 1999;6(1):P157–8.

Ye P, Carson J, D’Ercole AJ. In vivo actions of insulin-like growth factor-I (IGF-I) on brain myelination: studies of IGF-I and IGF binding protein-1 (IGFBP-1) transgenic mice. *J. Neurosci.* 1995;15(November):7344–56.

Ye P, Popken GJ, Kemper A, McCarthy K, Popko B, D’Ercole AJ. Astrocyte-specific overexpression of insulin-like growth factor-I promotes brain overgrowth and glial fibrillary acidic protein expression. *J. Neurosci. Res.* 2004;78(October):472–84.

Z

Zanette G, Manganotti P, Fiaschi A, Tamburin S. Modulation of motor cortex excitability after upper limb immobilization. *Clin. Neurophysiol.* 2004;115(6):1264–75.

Zange J, Müller K, Schuber M, Wackerhage H, Hoffmann U, Günther R, et al. Changes in calf muscle performance , energy metabolism , and muscle volume caused by long - term stay on space station MIR . *Int. J. Sports Med.* 1997;4:308–9.

Zehr EP. Considerations for use of the Hoffmann reflex in exercise studies. *Eur. J. Appl. Physiol.* 2002. p. 455–68.

Résumé :

L'hypodynamie-hypokinésie (HH) est une situation correspondant à une diminution des charges corporelles couplée à une diminution de l'activité motrice. Chez l'homme, cette situation est retrouvée lors d'une immobilisation, d'un alitement prolongé, d'un séjour en microgravité, ou plus simplement chez des individus sédentaires et/ou très âgés. L'HH entraîne une sévère altération de la performance motrice (équilibre, posture, locomotion), qui est due à une dégradation du système musculaire, mais également à une réorganisation du cortex sensorimoteur. Si l'altération du système musculaire est bien décrite dans la littérature, les mécanismes impliqués dans la plasticité corticale sont complexes et seulement partiellement élucidés. Une meilleure compréhension des systèmes mis en jeu lors de l'HH permettrait de développer des stratégies de prévention et/ou de récupération chez les personnes confrontées à cette situation.

L'objectif de cette thèse a été d'explorer les mécanismes de la réorganisation corticale, sur un modèle animal d'HH. Mon intérêt s'est plus particulièrement porté sur l'insulin-like growth factor 1 (IGF-1), une protéine ubiquitaire possédant de nombreux rôles au niveau cérébral (stimule l'angiogenèse et la neurogenèse, participe à la plasticité synaptique...), et décrite comme étant un acteur central des effets bénéfiques de l'exercice physique au niveau cérébral. Dans un premier temps, j'ai déterminé les conséquences de l'HH sur le système IGF-1 et les voies de signalisation associées dans plusieurs structures impliquées dans la motricité (cortex sensorimoteur, striatum, cervelet). Mes résultats montrent une sévère diminution des taux d'IGF-1 et de l'activation de la voie PI3K-AKT, et ce spécifiquement dans le cortex sensorimoteur. Dans un second temps, j'ai voulu déterminer si, en maintenant les taux corticaux d'IGF-1 pendant toute la durée de l'HH, il était possible de prévenir la réorganisation des cortex somesthésique et moteur, et ses conséquences délétères sur les fonctions sensorielle et motrice. J'ai démontré que l'IGF-1 prévient partiellement la réorganisation corticale et l'altération de la sensibilité tactile et de la performance motrice induites par l'hypoactivité.

Ainsi, l'ensemble de ces données suggère que la diminution des taux d'IGF-1 observée en condition d'hypoactivité joue un rôle clé dans la réorganisation du cortex sensorimoteur. De plus, notre étude montre qu'une prévention, même partielle, de cette réorganisation corticale peut induire une amélioration fonctionnelle.

Summary :

Hypodynamia-hypokinesia (HH) is defined as the absence of weight-bearing and a decrease in motor activity. In humans, it corresponds to all situations characterized by a chronic reduction in neuromuscular activity (immobilization, bed-rest, spaceflight, ageing...). HH results in a profound alteration in motor performance, in particular in posture, gait and locomotion. These impairments are due to alterations in the muscular system (atrophy, phenotypic changes...), but also to plastic changes in sensorimotor cortex. While the degradation of the muscular system is well described in the literature, the mechanisms involved in cortical plasticity are still unclear. A better understanding of the systems involved in HH would allow the development of preventive and/or recovery strategies for patients affected by HH.

In this regard, the objective of my thesis was to explore the mechanisms of cortical reorganization in a rodent model of HH. My interest was turned towards insulin-like growth factor 1 (IGF-1), a ubiquitous protein involved in many cerebral functions (angiogenesis, neurogenesis, synaptic plasticity). Several publications suggest that IGF-1 might mediate the beneficial effects of exercise on the brain. Thus, in the first part of the study, I have determined the effects of HH on IGF-1 level and the impact of its downstream main molecular pathways, in structures involved in motor control (sensorimotor cortex, striatum, cerebellum). My results indicate that HH induces a decrease in IGF-1 level specifically in the sensorimotor cortex. This alteration is associated to a decrease in activation of the PI3K-AKT pathway. The second part of this study was dedicated to determine whether a restoration of IGF-1 cortical levels during the whole unloading period might prevent reorganization of sensory and motor cortices, and functional alterations. My results show that IGF-1 treatment alleviate cortical reorganization. Additionally, it prevents some of the effects of HH on the sensory and motor functions.

Taken together, my results suggest that the decrease in the level of IGF-1 in the sensorimotor cortex plays a key role in the cortical reorganization induced by hypoactivity. Moreover, my work shows that the prevention of cortical reorganization, even when partial, can induce functional improvement in sensorimotor performance.



Hypoactivity Affects IGF-1 Level and PI3K/AKT Signaling Pathway in Cerebral Structures Implied in Motor Control

Julien Mysoet^{1,2}, Marie-Hélène Canu^{1,2}, Caroline Cieniewski-Bernard^{1,2}, Bruno Bastide^{1,2}, Erwan Dupont^{1,2*}

1 Université Lille Nord de France, Lille, France, 2 « Physical Activity, Muscle and Health » laboratory, EA 4488, IFR 114, Université Lille 1, Sciences et Technologies, Villeneuve d'Ascq, France

Abstract

A chronic reduction in neuromuscular activity through prolonged body immobilization in human alters motor task performance through a combination of peripheral and central factors. Studies performed in a rat model of sensorimotor restriction have shown functional and biochemical changes in sensorimotor cortex. However, the underlying mechanisms are still unclear. Interest was turned towards a possible implication of Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1), a growth factor known to mediate neuronal excitability and synaptic plasticity by inducing phosphorylation cascades which include the PI3K–AKT pathway. In order to better understand the influence of IGF-1 in cortical plasticity in rats submitted to a sensorimotor restriction, we analyzed the effect of hindlimb unloading on IGF-1 and its main molecular pathway in structures implied in motor control (sensorimotor cortex, striatum, cerebellum). IGF-1 level was determined by ELISA, and phosphorylation of its receptor and proteins of the PI3K–AKT pathway by immunoblot. In the sensorimotor cortex, our results indicate that HU induces a decrease in IGF-1 level; this alteration is associated to a decrease in activation of PI3K–AKT pathway. The same effect was observed in the striatum, although to a lower extent. No variation was noticed in the cerebellum. These results suggest that IGF-1 might contribute to cortical and striatal plasticity induced by a chronic sensorimotor restriction.

Citation: Mysoet J, Canu M-H, Cieniewski-Bernard C, Bastide B, Dupont E (2014) Hypoactivity Affects IGF-1 Level and PI3K/AKT Signaling Pathway in Cerebral Structures Implied in Motor Control. PLoS ONE 9(9): e107631. doi:10.1371/journal.pone.0107631

Editor: Michal Hetman, University of Louisville, United States of America

Received: December 10, 2013; **Accepted:** August 21, 2014; **Published:** September 16, 2014

Copyright: © 2014 Mysoet et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants from the Centre National d'Etudes Spatiales. The funder had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* Email: erwan.dupont@univ-lille1.fr

Introduction

It is admitted since a very long time that regular physical exercise is good for health. These last years, an increasing amount of studies has demonstrated that exercise promotes brain plasticity and has beneficial consequences on the brain, in young health population as well as during ageing [1–3]. Animal models of exercise suggest that training might enhance brain function through several mechanisms, such as neurogenesis, angiogenesis, synaptogenesis (for review, [4]) and increase in growth factors such as Brain Derived Nerve Factor (BDNF) and Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) [1,5]. In particular, the link between IGF-1 and exercise is well documented, and this molecule has been proposed as the mediator of exercise action on the brain.

At contrast with the numerous papers relating the relationships between physical activity and the brain, only a few reports concerned the effect of hypoactivity on the brain. Yet, a reduction of physical activity is commonly encountered by everyone throughout the life span, for instance during confinement to bed. Data performed by our team in the rat hindlimb unloading model (HU), a model of functional hypoactivity, have provided evidence for changes within the sensorimotor cortex. The excitability of pyramidal cells in the motor cortex is decreased [6,7], and their dendritic spine density is increased [8]. Recent studies have suggested that alterations in corticospinal excitability

should also be taken into account to explain the degradation of posture and locomotion in human following bed-rest [9,10]. This hypothesis is sustained by data by our team which put forward the role of motor cortex in motor disabilities induced by HU in rodents [11].

Today, our interest is turned towards the role of IGF-1 in the neuronal plastic mechanisms induced by HU. IGF-1 is a polypeptide synthesized by many tissues, including the brain. Its concentration is higher during development, but this growth hormone is also present during adulthood. The bioavailability of IGF-1 is modulated by IGF binding proteins (IGFBPs) that bind IGF-1 with high affinity. The release of IGF-1 by IGFBPs is regulated through mechanisms such as phosphorylation or protease-mediated shedding. IGF-1 plays several important roles in the brain, where it modulates synaptic plasticity, neuronal excitability, and dendritic growth ([12] for review). The effects of IGF-1 are mainly mediated through IGF-1 receptors. Receptor activation in turn recruits intracellular cascades, which includes the phosphoinositide 3-kinase (PI3K)–AKT and in a lesser extent mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways [12–15].

Now, the question that arises is whether, in contrast with exercise, deleterious effects of HU on motor performance are due to decrease in brain IGF-1 content. In a first attempt to answer this question, we determined whether hypoactivity affects IGF-1 level, IGF-1 receptor expression and activation, and its main signaling

pathway, i.e. PI3K/AKT, in various brain areas involved in motor control.

Methods

Ethics statement

All procedures described below were approved by both the Agricultural and Forest Ministry and the National Education Ministry (veterinary service of health and animal protection, authorization 59-00999). All efforts were made to minimize suffering.

Animals and treatment

Adult male Wistar rats (280–320 g) were randomly divided into two groups: C (control) and HU14 (Hindlimb Unloading for 14 days). The animals were housed under temperature and light controlled conditions (23°C, 12-h light/12-h dark cycle). Rats were acclimated at least one week after their arrival to the animal facility. They were regularly handled. Both groups were housed in the same room, with the same conditions, and had *ad libitum* access to food and water.

Hindlimb unloading was performed using the tail suspension model [16]. The rat's tail was washed with soapy water, rinsed, passed successively with alcohol and ether, and coated with a solution of collodion 4% (Merck). Once dry, the tail was surrounded with a hypoallergenic adhesive tape (Elastoplast). This cast was secured to an overhead swivel that permitted 360° rotation. The height was adjusted so that the inclination of the rat body formed an angle of 30° with the horizontal. This situation prevented the contact of the hindlimbs with the ground, whereas the rats were allowed to move freely on their forelimbs. HU14 rats were placed next to the other; thus, they can have social interactions with their neighbors, whereas C rats were housed with 2 other rats.

Tissue sampling

The blood and brain tissue samples were taken under deep anesthesia (sodium pentobarbital, 60 mg/kg) (Ceva Animal Health). Firstly, the thoracic cavity was open to allow access to the heart. A blood sample (1 ml) was obtained from the left ventricle. The blood was placed in a tube containing ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA; Becton Dickinson) to prevent coagulation, and placed on ice. After centrifugation (3000×g for 15 min), plasma was collected and immersed in liquid nitrogen and stored at −80°C. Intracardiac infusion of ice-cold solution of phosphate buffered saline containing dextrose (5 mM) was then performed until total exsanguination of the animal. Then, the head of the animal was fixed in a stereotaxic frame, the skin incised and a craniotomy was performed to expose the cerebral cortex. The dura-mater was resected. A sample of sensorimotor cortex was taken at stereotaxic coordinates anterior 0 to −2 and lateral 2 to 4, corresponding to the display area of the hindlimb, and at coordinates anterior −5 to −7 and lateral 3 to 6, corresponding to visual cortex. Striatum and cerebellum were removed. The samples were placed in liquid nitrogen and stored at −80°C. The total duration of the sampling did not exceed 7 min.

IGF-1 measurement

IGF-1 measurement was performed by an ELISA kit (Quantikine ELISA Mouse/Rat IGF-1, R&D Systems) on 14 rats (7 C and 7 HU). Brain samples were resuspended into an extraction buffer (15 µL of buffer/mg of tissue) developed by Adams et al. [17] [sodium acetate 7.5 mM; acetic acid 92.5 mM, pH 3.6; protease and phosphatase inhibitors (PhosSTOP phosphatase

inhibitor and complete mini protease inhibitor cocktail tablets, Roche)]. The acidic pH separates IGF Binding Protein from IGF-1 and makes IGF-1 more accessible to antibodies. The samples were extracted using a potter-elvehjem homogenizer, and then homogenized for 1 h at 4°C. Samples were finally centrifuged at 3000×g for 10 min at 4°C. The supernatants were recovered and 250 µL of extraction buffer was added back to the pellet. The samples were homogenized, centrifuged, and the supernatants were again recovered. The two supernatants were mixed and the solution is concentrated by Vivaspin 500 (cutoff 3 kDa, Sartorius Stedim Biotech) at 13000×g for 90 min at 4°C. The samples were dried by SpeedVac Concentrator (Thermo Scientific) at 30°C for 1 h and then stored at −20°C.

Brain samples were diluted in 250 µL of 0.1 M HEPES buffer, pH 7.8, centrifuged for 10 min at 3000×g, the supernatants were collected and the pH is adjusted to 7. Plasma samples were diluted in the “Calibrator Diluent RD5–38” supplied in the kit. The measurement and the reagents were prepared according to the instructions given by the manufacturer's instructions.

Pi3K-AKT signaling pathway analysis

Western blot analyses were performed on a total of 24 rats (n = 13 for C; n = 11 for HU14) in order to determine the activation status of several key signaling proteins such as IGF-1 receptor (n = 7–8 per group), Akt (n = 5–8 per group), GSK3β (n = 7–10 per group) and p70S6K (n = 4–7 per group) in brain structures.

Preparation of tissue extracts. The frozen brain samples were dropped in lysis buffer (10 µL of buffer/mg of tissue) containing 150 mM NaCl, 20 mM Tris Base, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, protease and phosphatase inhibitors (Roche). The samples were homogenized using a potter-elvehjem homogenizer, and centrifuged at 13000×g for 10 min at 4°C. The protein concentration of the supernatant was determined by a Bradford assay (Biorad).

Antibodies. Primaries antibodies against phosphorylated forms of IGF-1 receptor (Tyr1135/1136), AKT (Ser473), GSK3β (Ser9) and p70S6K (Thr308) and total forms of AKT, GSK3β and IGF-1 receptor, and HRP-conjugated anti-rabbit or anti-mouse secondary antibodies were purchased from Cell Signalling Technology. Antibody against total form of p70S6K was purchased from Abcam, and α-tubulin from Sigma Aldrich. All experimental procedures were optimized for each antibody.

Immunoblotting. The samples were diluted in SDS-PAGE sample buffer (50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 5% β-mercaptoethanol and 0.1% bromophenol blue), heated 7 min at 95°C and resolved on 7.5% SDS polyacrylamide gels. The proteins were transferred to a 0.2 µm nitrocellulose membrane. The membrane was blocked with 5% non-fat dry milk in Tris-buffered saline Tween (20 mM Tris-HCl, pH 7.6; 150 mM NaCl, and 0.5% Tween 20) at room temperature. The same membrane was processed in three sequential steps: incubation with (i) the antibody against phosphorylated form of protein; (ii) antibody against the total form; and (iii) antibody against α-tubulin. Blots were firstly incubated overnight at 4°C with anti-P-IGF-1 receptor, anti-P-AKT, anti-P-GSK3β or anti-P-p70S6K antibodies. For detection, the membranes were incubated with HRP-conjugated anti-rabbit secondary antibody at room temperature. Immunoreactivity was detected using enhanced chemiluminescence (PerkinElmer) and detection was carried out on hyperfilms Biomax MR (Amersham). Blots were stripped with Western Re-probe buffer (Agro-Bio). The efficiency of the stripping was tested by incubation with the secondary antibodies and a revelation by

chemiluminescent substrate. Blots were then re-probed with anti-IGF-1 receptor, anti-AKT, anti-GSK3 β or anti-p70S6K antibodies. Blots were incubated with HRP-conjugated anti-rabbit secondary antibody and visualized as described above. Finally, blots were incubated overnight at 4°C with anti- α -tubulin primary antibody and thereafter with HRP-conjugated anti-mouse secondary antibody. The signals were revealed as above to check that equal amounts of proteins are loaded on the gel.

Densitometric analysis. All blots were scanned and densitometric analysis was conducted using GS-800 Imaging densitometer and QuantityOne Software (Biorad). Phosphospecific signal was normalized to the total signal to estimate the ratio of activated marker. Total signal was normalized to the α -tubulin signal, which was used as an internal control, to estimate protein expression.

IGFBPs analysis

The expression of IGFBP3, IGFBP5 and the co-expression of IGF1 with these binding proteins were performed on plasma samples (n = 8 per group).

Albumin and IgG depletion. In order to evaluate the effect of HU on plasma IGF-1 environment, IGFBP3 and IGFBP5 were quantified on plasma samples depleted from albumin and IgG (ProteoPrep Blue Albumin and IgG Depletion kit, Sigma Aldrich). In a first step, 75 μ L of plasma were added into depletion column, incubated for 10 min at room temperature and centrifuged at 10000 \times g for 60 s. The procedure was performed twice to improve albumin depletion by reapplying the eluate on the column. In a second step, remaining unbound proteins from the spin column were washed 2 times with equilibration buffer by 60 s centrifugation and pooled with the eluate obtained in the first step. The total fractions were then stored at -20°C for further experiments.

Western blot analysis. Depleted plasma samples were separated on 15% SDS polyacrylamide gels and analyzed by western blot as previously described, using antibodies against IGFBP3 (Abnova) and IGFBP5 (Abcam).

In order to evaluate IGF-1 bioavailability, co-immunoprecipitations were performed on 900 μ g of depleted plasma samples. Each sample was first pre-cleared with protein G coupled on Magnetic Beads (Millipore). Non-retained samples were then incubated overnight with IGF-1 primary antibody (Abnova). Protein G coupled on magnetic beads was then added at a final dilution of 1/5 (v/v) for 1h30 at room temperature. Following this incubation, beads were washed 4 times with PBS 0.05% Tween and were finally resuspended in Laemmli buffer and boiled at 95°C for 10 min. Magnetic beads were carefully discarded and the remaining fraction was separated on 15% SDS polyacrylamide gels and analyzed by western blot using antibodies against IGFBPs.

Densitometric analysis. For IGFBP3 and IGFBP5, total protein signals were normalized to ponceau S densitometric signal. For co-immunoprecipitation experiments, the quantification of IGF-1 bound to IGFBPs was normalized to the total form of IGFBP3 and IGFBP5.

Statistical analyses

Results are presented as mean \pm SEM. Normality was evaluated by Kolmogorov-Smirnov test. C and HU14 groups were compared by Student *t*-test when groups were normal or Mann-Whitney *t*-test otherwise. When the groups had significantly different variances, a *t*-test with Welch's correction was performed. Variances of IGF-1 plasma were compared by Barlett's test. The relationship between plasma and tissue levels of IGF-1 was assessed using the Pearson correlation coefficient. A *p*-value of less

than 0.05 was chosen as the significance level for all statistical analyses.

Results

IGF-1 measurement in cerebral tissue and plasma

We quantified IGF-1 in the sensorimotor cortex, the striatum and the cerebellum, and in one structure used as internal control (visual cortex) (Fig. 1A). In C rats, IGF-1 level was between 5 and 10 pg/mg in the different structures. After HU, IGF-1 level was decreased in the sensorimotor cortex (-28%; *p*<0.001). Levels were unchanged in striatum and cerebellum, and in control structure (visual cortex). It should be mentioned that values were homogenous in the C group whereas they were more scattered in HU14 group, except for sensorimotor cortex.

Although IGF-1 can be produced by the brain, the very low expression of IGF1 mRNA and the wide expression of IGF receptors in the adult mammalian brain suggest that the main source of IGF-1 in the brain corresponds to circulating IGF-1 [12].

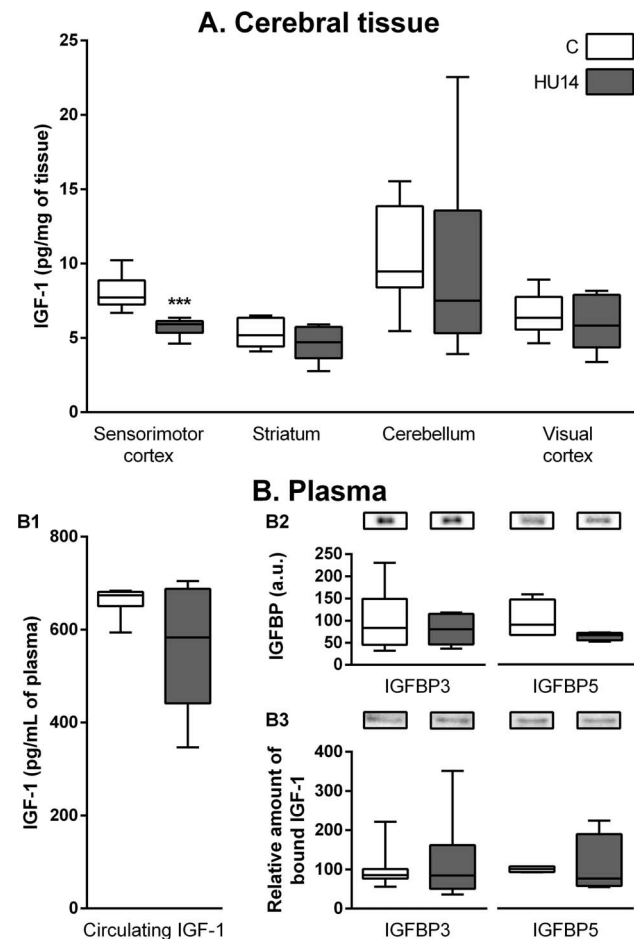


Figure 1. Effect of HU on IGF-1 level. (A) IGF-1 level in cerebral tissues, determined by ELISA, in control (C) and HU14 groups. (B) IGF-1 measurement in plasma. B1: Circulating IGF-1 determined by ELISA. B2: Total IGFBP3 (left) and IGFBP5 (right) expressed with respect to total protein level. B3: Quantification of IGF-1 bound to IGFBP3 (left) or IGFBP5 (right), expressed as the ratio between bounded IGF-1 and total IGFBPs, and representative western blot showing IGFBPs after IGF-1 immunoprecipitation. Box and whisker plots show the median (horizontal bar), quartiles (box), and extreme values (whiskers). *** *p*<0.001 with respect to C value.

doi:10.1371/journal.pone.0107631.g001

Thus, we wanted to determine whether plasma level was affected by HU. The IGF-1 plasma level was 660 ± 12 pg/mL in C rats (Fig. 1B1). It was reduced in HU rats (545 ± 50 pg/mL), although not significantly ($p = 0.06$), due to a high individual variability between samples in this group (coefficient of variation: 24% in HU14 rats *vs.* 5% in C ones, Barlett's test: $p < 0.01$).

Next, we determined whether changes in IGFBP levels could be responsible for the decrease in IGF-1 levels observed in the brain, since it has been shown that IGF-1 entry within the brain is decreased in presence of IGFBP3 [18]. No variations were found after HU, neither in the total IGFBP level (Fig. 1B2), nor in the relative quantity of IGF-1 bound to IGFBP3 or IGFBP5 (Fig. 1B3).

IGF-1 enters into the brain through the blood brain barrier. In order to determine whether the decrease in IGF-1 cerebral level was directly related to the decrease in plasmatic one, we performed a correlation analysis. Tissue level was plotted against plasma level in individual rats (Table 1). Pearson correlation coefficient indicated no relationship for both groups and for the different structures.

Phosphorylation and expression level of IGF-1 receptor

IGF-1 exerts its function by binding to and activating its specific receptor (IGF-1R). Thus, we next evaluated the phosphorylation level of IGF-1R in the brain, and its expression level by western blot (Fig. 2). IGF-1 receptor phosphorylation level was expressed as the ratio between P-IGF-1R and IGF-1R levels. This level decreased in sensorimotor cortex (-82% , $p < 0.001$), striatum (-60% , $p < 0.01$) and visual cortex (-30% , $p < 0.05$) but not in the cerebellum. This decrease can be explained by a decrease in IGF-1R phosphorylation since IGF-1R expression level, normalized to α -tubulin, was unchanged.

Phosphorylation and expression level of PI3K-AKT pathway proteins

IGF-1R in brain is associated with PI3K-AKT signaling pathway. Phosphorylation and expression level of AKT, p70S6K and GSK3 β proteins were evaluated in order to determine whether the decrease in IGF-1R phosphorylation after HU induced a modulation of this pathway.

In the sensorimotor cortex (Fig. 3A), AKT phosphorylation level was decreased in HU rats (-45% , $p < 0.05$) whereas AKT expression was increased ($+40\%$, $p < 0.05$). p70S6K and GSK3 β are two downstream targets of AKT. The phosphorylation level was decreased for p70S6K (-37% , $p < 0.01$) and remained constant for GSK3 β . The expression level of these proteins was unchanged in HU14 group.

AKT phosphorylation also showed a decrease in the striatum (-56% , $p < 0.05$), without any change in expression level (Fig. 3B).

For p70S6K, no change was found in phosphorylation level, but at contrast with other structures, data revealed an increase in expression level ($+84\%$, $p < 0.05$). For GSK3 β , neither phosphorylation level, nor expression one were affected by HU.

In the cerebellum (Fig. 3C), our results indicate no variation in phosphorylation or expression levels of the PI3K-AKT pathway members.

In the visual cortex (Fig. 3D), a decrease of AKT phosphorylation was observed (-54% , $p < 0.05$). The expression level was unchanged. This reduction in AKT phosphorylation had no consequence on its target p70S6K, since no change was noticed in its phosphorylation or expression level.

Discussion

We have investigated the impact of hypoactivity on IGF-1 and associated signaling pathway in structures implied in motor functions (sensorimotor cortex, striatum and cerebellum). We observed several changes in the visual cortex, suggesting that HU can induce an overall effect on the brain. However, the main changes were observed in somatosensory cortex and striatum, where HU leads to a decrease in IGF-1 level; this effect is correlated to a decrease in activation of its receptor and downstream targets (AKT and p70S6K, but not in GSK3 β). Taken together, the present results suggest that a low physical activity might induce functional alterations of sensorimotor cortex through a decrease in IGF-1 pathway.

HU has an effect on the whole brain

HU induces changes in tissue IGF-1 level, in activation of its specific receptor, and in its associated signaling pathway, in sensorimotor cortex and striatum, and with less intensity in the visual cortex. It suggests that HU can affect the whole brain. Ultrastructural changes similar to those described for somatosensory cortex have been described in the visual cortex of rats exposed to a 7-day or 14-day spaceflight [19]. HU reproduces the chronic weightless bearing, reduction in hindlimb movement and cephalic fluid shift observed in real microgravity. The large-scale action of HU on the brain can be the result of the cephalic fluid shift, which in turn produces, in primates as in rats, changes in intracranial blood volume, regional blood flow, vascular resistance capillary filtration, and even edema [20].

Plasmatic IGF1 level tends to decrease in HU rats

Several investigators have found a correlation between exercise, plasma IGF-1 level, and secretion of growth hormone (GH), the main regulator of IGF-1 secretion by the liver. However, to our knowledge, the effects of a decrease in physical activity on plasma IGF-1 level have rarely been explored. Our results showing that

Table 1. Regression analysis performed between IGF-1 level in different cerebral tissues and plasma.

	Control	r^2	HU14	r^2
	Slope		Slope	
Sensorimotor cortex	0.02 ± 0.02	0.14	0.00 ± 0.00	0.12
Striatum	0.02 ± 0.01	0.53	0.01 ± 0.01	0.71
Cerebellum	-0.06 ± 0.05	0.29	-0.02 ± 0.04	0.15
Visual cortex	0.02 ± 0.03	0.06	0.01 ± 0.00	0.38

r^2 is the coefficient of determination. Data are mean \pm SEM.

doi:10.1371/journal.pone.0107631.t001

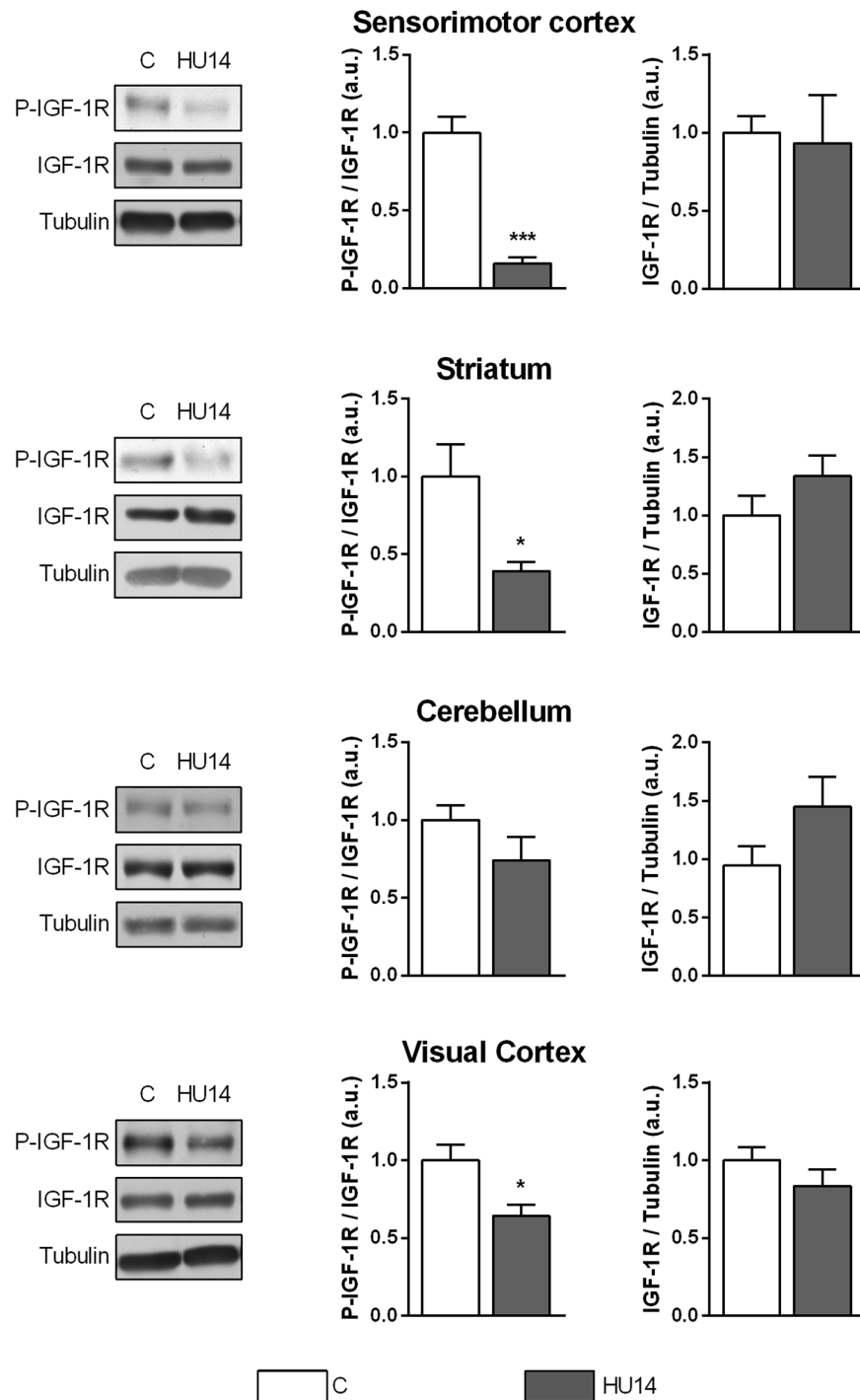


Figure 2. Phosphorylation and expression level of IGF-1R in brain. Left: representative western blot showing P-IGF-1R and total IGF-1R immunoreactivity in control (C) or HU14 groups. Middle: level of phosphorylation of IGF-1R, expressed as the ratio between P-IGF-1R and IGF-1R, in C and HU14 groups. * and *** $p < 0.05$ and $p < 0.001$ respectively, with respect to C group. Right: expression of IGF-1R, corresponding to the ratio between IGF-1R and α -tubulin). Values are mean \pm SEM. doi:10.1371/journal.pone.0107631.g002

IGF-1 serum level tended to decrease after a 14-day period of HU are in accordance with Perrien et al. [21].

The two relevant sources of IGF-1 in the periphery are the liver and the muscle. Thus, a muscle contribution to the reduction of the circulating blood levels should be considered. However, the expression of IGF-1 mRNA is unaffected in the soleus muscle of

rats submitted to 14 days of HU [22] and of mice unloaded for 8 days [23], or in human vastus lateralis after 5 weeks of limb unloading [24]. These data suggest that the decrease in IGF-1 plasmatic level is mainly due to a lower synthesis within the liver.

The decrease in IGF-1 level might be due to the decrease in GH secretion induced by HU [25]. Besides, we cannot exclude that

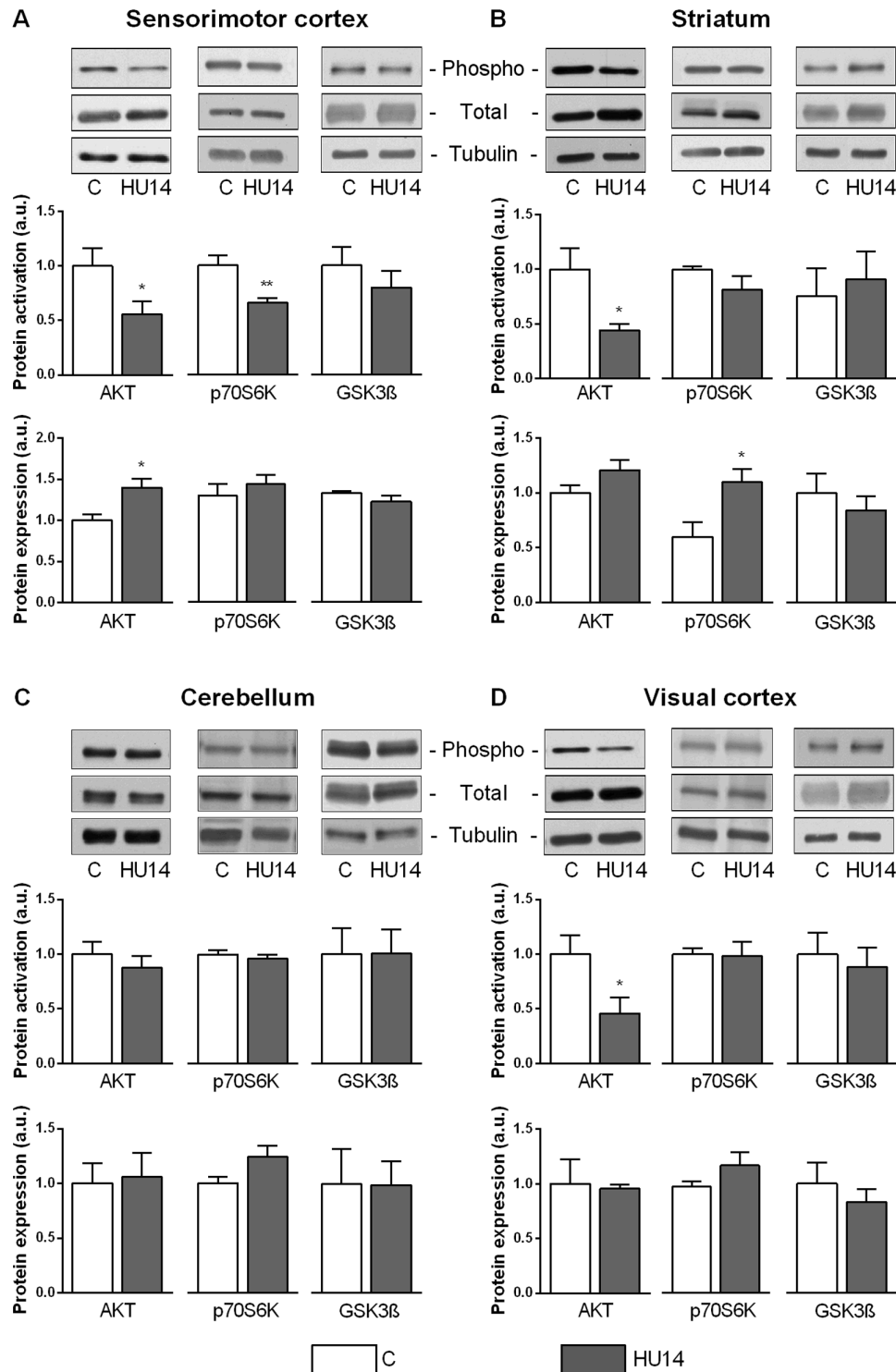


Figure 3. Phosphorylation and expression level of proteins of the PI3K-AKT pathway in brain. Representative western blot showing immunoreactivity for phosphorylated and total forms of AKT, p70S6K and GSK3 β (above), phosphorylation level (middle), and expression level (below) in control or HU14 groups, in sensorimotor cortex (A), striatum (B), cerebellum (C) and visual cortex (D). *and ** $p < 0.05$ and $p < 0.01$ respectively with respect to C group. Values are mean \pm SEM. doi:10.1371/journal.pone.0107631.g003

IGF-1 level varies in response to a stress induced by the unloading procedure since a chronic stress is known to decrease the IGF-1 level [26]. However, we found no change in the level of blood corticosterone in rats submitted to 14 days of HU (Figure S1).

IGF-1 level is strongly decreased in sensorimotor cortex of HU rats

A decrease in tissue IGF-1 has already been demonstrated in the spinal cord of rats following unilateral hindlimb immobilization

[27]. Our first hypothesis is that local synthesis of IGF-1 might be affected by hypoactivity. However, only small amounts of IGF-1 mRNA have been detected in the adult cerebral cortex and in the striatum [28], and the main origin of IGF-1 in the brain is peripheral. In adult, serum and brain IGF-1 levels are strongly dependent; for instance, a reduction in circulating IGF-1 using a viral vector approach decreases hippocampal IGF-1 protein levels [29]. Relative amount of IGF-1 mRNA is more than 100 times higher in the liver than in the brain [28], and approximately 95% of the IGF-1 that acts on the brain is derived from the liver [30]. Thus, it is very likely that even a significant change in paracrine IGF-1 gene expression should be negligible with respect to the circulating (endocrine) IGF-1. However, the correlation analysis showed the absence of linkage between serum and brain tissue levels. One should take into account the blood brain barrier. Entry of IGF-1 from the plasmatic compartment into the brain can be achieved through the intervention of blood brain barrier and the blood cerebrospinal fluid barrier. Data indicate that the choroid plexus is the major route of entry of IGF-1 into the brain [31]. Exercise is known to increase brain uptake of IGF-1 [1], at least in part through the choroid plexus, since exercise increases the level of megalin, a transporter involved in IGF-1 transport into the brain [32]. However, whether disuse affects megalin level is unknown. A recent study showed that uptake of serum IGF-1 by the blood brain barrier is activity-dependent: neuronal activity elicited by sensory or behavioral stimulation increases IGF-1 entrance in activated regions but not in other parts of the brain [18]. In our study, HU is characterized by a reduced motor activity and by a deactivation of the cutaneous receptors located on the foot sole. Thus, we can hypothesize that the activity of neurons in the hindlimb cortical representation is reduced and in consequence, the permeability of blood brain barrier for IGF-1 should be decreased in the sensorimotor cortex.

IGF-1 level and activation of receptors was remarkably constant within the cerebellum. In control rats, cerebellum shows high levels of IGF-1. This is consistent with previous reports [33]. Local synthesis [28] and receptor density [34] are three times more abundant in the cerebellum than in the cerebral cortex or striatum. Given the well known implication of cerebellum in sensorimotor control, one would expect a decrease in tissue IGF-1 level after HU but we did not detect any variation in this structure. This result can be explained by the unloading protocol: suspending the rats from the ground at a 30° angle influences the head position as well as the neck angle. The activity of the cerebellum which receives information from the otolithic organs and neck proprioceptors [35] may be changed accordingly. Thus, a putative effect of hypoactivity could have been masked by the posture change induced by the HU procedure.

HU does not affect the level of IGF-1 receptors, but decreases their activation in sensorimotor cortex

After binding to its receptor, IGF-1 induces the beta-subunit autophosphorylation of the receptor. We found no change in IGF-1 receptors following 2 weeks of disuse. This result is in accordance with Suliman et al. [27], who explored the regulation of IGF-1 receptor in the spinal cord. These authors found no change after a 2-wk period of immobilization, however, an upregulation of IGF-1 receptors was observed after a long-term immobilization (4 and 8 weeks). An increase has also been observed in the cerebellum of aged rats [36] and in the spinal cord of amyotrophic lateral sclerosis patients [37]. Taken together, these data suggest that a longer period of HU (i.e. >2 weeks) might also induce an upregulation of IGF-1 receptors. The latter

can be viewed as a homeostatic mechanism to compensate for the reduction in IGF-1 level in brain tissue.

We also reported a decrease in receptor phosphorylation. It can be the consequence of the lower level of IGF-1 in tissue, and/or of a higher level of IGF binding proteins, internalization or desensibilisation of IGF-1R, or dephosphorylation by action of phosphatases.

The role of striatum in the planning and modulation of movement pathways is well documented [38]. A reduction of excitatory cortical input in the striatum during HU will in turn affect striatal cells discharge. As expected, HU decreases receptor activation. However, effect on the signaling pathway is only moderate since basal ganglia are not devoted to strictly motor functions, but are also involved in cognitive functions.

Consequences of IGF-1 receptor activation and functional implications of the decrease in IGF-1 level

IGF-1 is involved in dendritic structure and synaptic connectivity. In postnatal rat slice cultures of somatosensory cortex, IGF-1-treatment leads to increased dendritic branching of pyramidal neurons [39], whereas application of an IGF-1 antibody prevents exercise-induced increase of dendritic spines within the hippocampus [40]. This effect is mediated by the PI3K/AKT/mTOR/p70S6K cascade [41]. As a consequence, the decrease in p70S6K phosphorylation observed in the sensorimotor cortex of HU rats should have induced a decrease in spine density and in dendritic length. In a recent study [8], we observed a decrease in the diameter of dendritic branches and in spine length, which is consistent with a role of IGF-1 in dendritic growth. However, we also reported an increase in the density of dendritic spines. Such an increase in spine density is puzzling in view of the present results. However, dendritic spines maintenance can be impacted by other substances, such as NGF or BDNF, which expression are increased in the sensorimotor cortex of HU rats [42].

IGF-1 is also known to modulate cell activity by regulating calcium entry into cells. IGF-1 stimulates calcium entry by translocating a specific channel (“growth-factor-regulated channel”) to the plasma membrane, via a PI3K dependent mechanism [43]. In addition, Blair and Marshall [44] provided evidence for a large increase in calcium channel currents in cerebellar granule neurons in response to IGF-1, mediated by PI3K. In the same way, IGF-1 enhances Ca²⁺ channel currents in pyramidal neurons of motor cortex in the rat [45], but the intracellular pathway mediating this effect is unknown. Thus, a decrease in IGF-1 level could be associated to a decrease in calcium entry, and might affect neurotransmitter release and firing behavior of pyramidal neurons. It could be the substrate of the decrease in neuronal excitability observed in deep layers of the motor cortex of HU rats [46]. At the opposite to layer V neurons, the activity is increased in layer IV within the sensorimotor cortex [38,47]. The fact that IGF-1 receptors are mainly located in supra- and infragranular layers, but more rarely in granular one ([34] and Figure S2) sustains the hypothesis of a participation of IGF-1 to a Hebbian mechanism of activity-dependent regulation of neuronal excitability, leading to a hypoexcitability of corticospinal fibers.

Conclusion

IGF-1 is often considered as the central node of a complex system of homeostatic regulation [12], and as the mediator of exercise-induced benefits on the brain [1,3]. However, studies explored mainly the effect of exercise on cognition and hippocampus, more rarely the consequences of physical activity on the sensorimotor system. Yet, the functional repercussions of the changes in IGF-1 level and associated signaling pathway in

structures involved in sensorimotor control should be determined. In the dorsal column nuclei, intracarotid injection of IGF-1 increases the response of neurons to a peripheral stimulus, and increases the extension of receptive fields [48]. These effects are similar to those observed in the cerebral cortex of HU rats [47,49], where IGF-1 level is dramatically lowered. In this perspective, the relationships between IGF-1 and the somatosensory cortical representation of the body merits further exploration. A better knowledge of the role of IGF-1 in activity-dependent plasticity might allow identifying new target for therapeutic tools for immobilized patients.

Supporting Information

Figure S1 Corticosterone level is transiently increased within the first three days of unloading, and recovered normal values after 7 days. The same observation has also been made by others [16]. Thus, the decrease in IGF-1 plasmatic level cannot be attributed to a response to stress. The level of blood corticosterone was determined in C rats, and in rats submitted to 3, 7 or 14 days of HU. After rat decapitation, a blood sample was taken in a tube containing EDTA (Becton Dickinson) to prevent coagulation and placed in ice. Plasma was collected after centrifugation (3000×g for 15 min), froze in liquid nitrogen and store at -80°C . Corticosterone levels were evaluated with an ELISA kit (Corticosterone EIA, Immunodiagnostic systems). All procedure (plasma sample, dilution solution, measurement and reagent preparation) was performed according to the instruction given by the constructor protocol. Data are mean \pm SEM. * $p < 0.05$ with respect to Control value, # $p < 0.05$ with respect to HU value.

References

- Cotman CW, Berchtold NC, Christie LA (2007) Exercise builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation. *Trends Neurosci* 30: 464–472.
- Rolland Y, Abellan van Kan G, Vellas B (2010) Healthy brain aging: role of exercise and physical activity. *Clin Geriatr Med* 26: 75–87.
- Voss MW, Nagamatsu LS, Liu-Ambrose T, Kramer AF (2011) Exercise, brain, and cognition across the life span. *J Appl Physiol* 111: 1505–1513.
- Adkins DL, Boychuk J, Remple MS, Kleim JA (2006) Motor training induces experience-specific patterns of plasticity across motor cortex and spinal cord. *J Appl Physiol* 101: 1776–1782.
- Llorens-Martín M, Torres-Alemán I, Trejo JL (2008) Growth factors as mediators of exercise actions on the brain. *Neuromolecular Med* 10: 99–107.
- Canu MH, Picquet F, Bastide B, Falempin M (2010) Activity-dependent changes in the electrophysiological properties of regular spiking neurons in the sensorimotor cortex of the rat in vitro. *Behav Brain Res* 209: 289–294.
- Langlet C, Bastide B, Canu MH (2012) Hindlimb unloading affects cortical motor maps and decreases corticospinal excitability. *Exp Neurol* 237: 211–217.
- Trinel D, Picquet F, Bastide B, Canu MH (2013) Dendritic spine remodeling induced by hindlimb unloading in adult rat sensorimotor cortex. *Behav Brain Res* 249: 1–7.
- Moisello C, Bove M, Huber R, Abbruzzese G, Battaglia F, et al. (2008) Short-term limb immobilization affects motor performance. *J Mot Behav* 40: 165–176.
- Roberts DR, Ramsey D, Johnson K, Kola J, Ricci R, et al. (2010) Cerebral cortex plasticity after 90 days of bed rest: data from TMS and fMRI. *Aviat Space Environ Med* 81: 30–40.
- Canu MH, Garnier C (2009) A 3D analysis of fore- and hindlimb motion during overground and ladder walking: comparison of control and unloaded rats. *Exp Neurol* 218: 98–108.
- Fernandez AM, Torres-Alemán I (2012) The many faces of insulin-like peptide signalling in the brain. *Nat Rev Neurosci* 13: 225–239.
- Bondy CA, Cheng CM (2004) Signaling by insulin-like growth factor I in brain. *Eur J Pharmacol* 490: 25–31.
- Zheng WH, Quirion R (2004) Comparative signaling pathways of insulin-like growth factor-1 and brain-derived neurotrophic factor in hippocampal neurons and the role of the PI3 kinase pathway in cell survival. *J Neurochem* 89: 844–852.
- Vogel T (2013) Insulin/IGF-Signalling in Embryonic and Adult Neural Proliferation and Differentiation in the Mammalian Central Nervous System. In: Wislet-Gendebien S, editor. *Trends in Cell Signaling Pathways in Neuronal Fate Decision*. InTech. Available: <http://www.intechopen.com/books/trends-in-cell-signaling-pathways-in-neuronal-fate-decision/insulin-igf-signalling-in-embryonic-and-adult-neural-proliferation-and-differentiation-in-the-mammalian>. Accessed 22 November 2013.
- Morey-Holton ER, Globus RK (2002) Hindlimb unloading rodent model: technical aspects. *J Appl Physiol* 92: 1367–1377.
- Adams MM, Forbes EM, Linville CM, Riddle DR, Sonntag WE, et al. (2009) Stability of local brain levels of insulin-like growth factor-I in two well-characterized models of decreased plasma IGF-I. *Growth Factors* 27: 181–188.
- Nishijima T, Piriz J, Dufloy S, Fernandez AM, Gaitan G, et al. (2010) Neuronal activity drives localized blood-brain-barrier transport of serum insulin-like growth factor-I into the CNS. *Neuron* 67: 834–846.
- Krasnov IB (1994) Gravitational neuromorphology. *Adv Space Biol Med* 4: 85–110.
- Watenpaugh DE, Hargens AR (1996) The Cardiovascular System in Microgravity. In: Fregly MJ, Blatteis CM, editors. *Handbook of Physiology*, vol. 1. New York: Oxford University Press, 631–674.
- Perrien DS, Akel NS, Dupont-Versteegden EE, Skinner RA, Siegel ER, et al. (2007) Aging alters the skeletal response to disuse in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292: R988–996.
- Heinemeier KM, Olesen JL, Haddad F, Schjerling P, Baldwin KM, et al. (2009). Effect of unloading followed by reloading on expression of collagen and related growth factors in rat tendon and muscle. *J Appl Physiol* 106: 178–186.
- Aweide B, Thissen JP, Gailly P, Lebacqz J (1999) Regulation of IGF-I, IGFBP-4 and IGFBP-5 gene expression by loading in mouse skeletal muscle. *FEBS Letters* 461: 263–267.
- Haddad F, Baldwin KM, Tesch PA (2005) Pretranslational markers of contractile protein expression in human skeletal muscle: effect of limb unloading plus resistance exercise. *J Appl Physiol* 98: 46–52.
- Bigbee AJ, Grindeland RE, Roy RR, Zhong H, Gosselink KL, et al. (2006) Basal and evoked levels of bioassayable growth hormone are altered by hindlimb unloading. *J Appl Physiol* 100: 1037–1042.
- Sonntag WE, Ramsey M, Carter CS (2005) Growth hormone and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and their influence on cognitive aging. *Ageing Res Rev* 4: 195–212.
- Suliman IA, Lindgren JU, Elhassan AM, Diab KM, Adem A (2001) Effects of short- and long-term rat hind limb immobilization on spinal cord insulin-like growth factor-I and its receptor. *Brain Res* 912: 17–23.
- Rotwein P, Burgess SK, Milbrandt JD, Krause JE (1988) Differential expression of insulin-like growth factor genes in rat central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 265–269.
- Mitschelen M, Yan H, Farley JA, Warrington JP, Han S, et al. (2011) Long-term deficiency of circulating and hippocampal insulin-like growth factor I induces depressive behavior in adult mice: a potential model of geriatric depression. *Neuroscience* 185: 50–60.

30. Yamamoto H, Murphy LJ (1995) Enzymatic conversion of IGF-I to des(1-3)IGF-I in rat serum and tissues: a further potential site of growth hormone regulation of IGF-I action. *J Endocrinol* 146: 141–148.
31. Carro E, Nuñez A, Busiguina S, Torres-Aleman I (2000) Circulating insulin-like growth factor I mediates effects of exercise on the brain. *J Neurosci* 20: 2926–2633.
32. Carro E, Spuch C, Trejo JL, Antequera D, Torres-Aleman I (2005) Choroid plexus megalin is involved in neuroprotection by serum insulin-like growth factor I. *J Neurosci* 25: 10884–10893.
33. Yamaguchi F, Itano T, Mizobuchi M, Miyamoto O, Janjua NA, et al. (1990) Insulin-like growth factor I (IGF-I) distribution in the tissue and extracellular compartment in different regions of rat brain. *Brain Res* 533: 344–347.
34. Kar S, Chabot JG, Quirion R (1993) Quantitative autoradiographic localization of [125I]insulin-like growth factor I, [125I]insulin-like growth factor II, and [125I]insulin receptor binding sites in developing and adult rat brain. *J Comp Neurol* 333: 375–397.
35. Cullen KE, Roy JE (2004) Signal processing in the vestibular system during active versus passive head movements. *J Neurophysiol* 91: 1919–1933.
36. Chung YH, Shin CM, Joo KM, Kim MJ, Cha CI (2002) Age-related upregulation of insulin-like growth factor receptor type I in rat cerebellum. *Neurosci Lett* 330: 65–68.
37. Doré S, Kar S, Quirion R (1997) Rediscovering an old friend, IGF-I: potential use in the treatment of neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci* 20: 326–331.
38. Middleton FA, Strick PL (2000) Basal ganglia and cerebellar loops: motor and cognitive circuits. *Brain Res Rev* 31: 236–250.
39. Niblock MM, Brunso-Bechtold JK, Riddle DR (2000) Insulin-like growth factor I stimulates dendritic growth in primary somatosensory cortex. *J Neurosci* 20: 4165–4176.
40. Glasper ER, Llorens-Martin MV, Leuner B, Gould E, Trejo JL (2010) Blockade of insulin-like growth factor-I has complex effects on structural plasticity in the hippocampus. *Hippocampus* 20: 706–712.
41. Lee CC, Huang CC, Hsu KS (2011) Insulin promotes dendritic spine and synapse formation by the PI3K/Akt/mTOR and Rac1 signaling pathways. *Neuropharmacology* 61: 867–879.
42. Dupont E, Canu MH, Stevens L, Falempin M (2005) Effects of a 14-day period of hindpaw sensory restriction on mRNA and protein levels of NGF and BDNF in the hindpaw primary somatosensory cortex. *Mol Brain Res* 133: 78–86.
43. Kanzaki M, Zhang YQ, Mashima H, Li L, Shibata H, et al. (1999) Translocation of a calcium-permeable cation channel induced by insulin-like growth factor-I. *Nat Cell Biol* 1: 165–170.
44. Blair LA, Marshall J (1997) IGF-1 modulates N and L calcium channels in a PI 3-kinase-dependent manner. *Neuron* 19: 421–429.
45. Shan H, Messi ML, Zheng Z, Wang ZM, Delbono O (2003) Preservation of motor neuron Ca²⁺ channel sensitivity to insulin-like growth factor-1 in brain motor cortex from senescent rat. *J Physiol* 553: 49–63.
46. Langlet C, Canu MH, Viltart O, Sequeira H, Falempin M (2001) Hypodynamia – hypokinesia induced variations in expression of fos protein in structures related to somatosensory system in the rat. *Brain Res* 905: 72–80.
47. Dupont E, Canu MH, Falempin M (2003) A 14-day period of hindpaw sensory deprivation enhances the responsiveness of rat cortical neurons. *Neuroscience* 121: 433–439.
48. Nuñez A, Carro E, Torres-Aleman I (2003) Insulin-like growth factor I modifies electrophysiological properties of rat brain stem neurons. *J Neurophysiol* 89: 3008–3017.
49. Dupont E, Stevens L, Cochon L, Falempin M, Bastide B, et al. (2011) ERK is involved in the reorganization of somatosensory cortical maps in adult rats submitted to hindlimb unloading. *PLoS One* 6(3): e17564.

ROLE OF IGF-1 IN CORTICAL PLASTICITY AND FUNCTIONAL DEFICIT INDUCED BY SENSORIMOTOR RESTRICTION.

Julien MYSOET, Erwan DUPONT, Bruno BASTIDE, Marie-Hélène CANU

Laboratoire « Activité Physique, Muscle et Santé », EA 4488, IFR 114, Université Lille 1,
Sciences et Technologies, F-59650 Villeneuve d'Ascq, France
Unité de Recherche Pluridisciplinaire Sport, Santé, Société (URePSSS)
Université Lille Nord de France, F-59000 Lille, France

E-Mail addresses

julien.mysoet@univ-lille1.fr
erwan.dupont@univ-lille1.fr
bruno.bastide@univ-lille1.fr
marie-helene.canu@univ-lille1.fr

Corresponding author:

Marie-Hélène CANU
Laboratoire « Activité Physique, Muscle et Santé », EA 4488, IFR 114
Université Lille Nord de France
Université Lille 1, Sciences et Technologies
Bâtiment SN4
F-59655 Villeneuve d'Ascq cedex
Telephone number: (33) 3 20 33 70 87
Fax number: (33) 3 20 43 68 88
E-mail address: marie-helene.canu@univ-lille1.fr

ABSTRACT

In the adult rat, sensorimotor restriction by hindlimb unloading (HU) is known to induce impairments in motor behavior as well as a disorganization of somatosensory cortex (shrinkage of the cortical representation of the hindpaw, enlargement of the cutaneous receptive fields, decreased cutaneous sensibility threshold). Recently, our team has demonstrated that IGF-1 level was decreased in the somatosensory cortex of rats submitted to a 14-day period of HU. To determine whether IGF-1 is involved in these plastic mechanisms, a chronic cortical infusion of this substance was performed by means of osmotic minipump. When administered in control rats, IGF-1 affects the size of receptive fields and the cutaneous threshold, but has no effect on the somatotopic map. In addition, when injected during the whole HU period, IGF-1 is interestingly implied in cortical changes due to hypoactivity: the shrinkage of somatotopic representation of hindlimb is prevented, whereas the enlargement of receptive fields is reduced. IGF-1 has no effect on the increase in neuronal response to peripheral stimulation. We also explored the functional consequences of IGF-1 level restoration on tactile sensory discrimination. In HU rats, the percentage of paw withdrawal after a light tactile stimulation was decreased, whereas it was similar to control level in HU-IGF-1 rats. Taken together, the data clearly indicate that IGF-1 plays a key-role in cortical plastic mechanisms and in behavioral alterations induced by a decrease in sensorimotor activity.

HIGHLIGHTS

- Sensorimotor restriction affects cortical organization and paw withdrawal.
- IGF-1 prevents cortical shrinkage, and partially receptive field enlargement.
- IGF-1 does not prevent the changes in sensibility threshold.
- IGF-1 prevents alteration of the paw withdrawal score.

KEYWORDS

Disuse, hindlimb unloading, adult rat, cutaneous receptive fields, somatotopy, cortical plasticity, tactile sensation, electrophysiology, von Frey monofilaments.

ABBREVIATIONS

HU: hindlimb unloading; RF: receptive field; C: control; IGF-1: insulin-like growth factor-1

INTRODUCTION

Prolonged bed-rest, ageing, or even extreme conditions such as spaceflight, are characterized by a chronic reduction in neuromuscular activity. In humans, these situations result in a profound alteration in motor task performance (posture, gait, functional mobility...) (for review Fortney et al. 1996; Roberts et al. 2010; Viguier et al. 2009). These impairments are due to a combination of factor including muscle alteration and plastic changes in neural function throughout the nervous system (Clark et al., 2006).

Hindlimb unloading (HU) is a rodent model of disuse commonly used to improve our understanding on effects of confinement to bed or sensorimotor restriction (Morey-Holton and Globus, 2002). During HU, the contact of the plantar sole of the hindlimb with the ground is prevented and the proprioceptive input from the limb is dramatically reduced. This elevation of the lower limbs during 14 days induces impairments in the postural and locomotor tasks (Canu and Garnier, 2009), which might be the result of an alteration in the functioning of supraspinal structures. Through cortico-cortical loops linking sensory and motor cortices, an alteration of the somatosensory pathway in HU rats might impact the cortical control of muscles. As a matter of fact, our previous studies have shown that HU has deleterious effects on the functioning of somatosensory cortex. A shrinkage of the foot somatotopic representation and an enlargement of the cutaneous receptive fields (RFs) (Dupont et al., 2003; Langlet et al., 1999) are reported. In addition, cortical neurons are activated for lower pressure applied on the paw, i.e. tactile sensitivity is increased. However, the mechanisms involved in these plastic mechanisms are still unclear, even if implication of neurotransmitters (Canu et al., 2006; D'Amelio et al., 1996), or neurotrophins (Dupont et al., 2005), and their associated signaling pathways (Dupont et al., 2011) have been shown. In particular, we have recently shown that the decrease in sensorimotor activity in HU rats is accompanied by a decrease in IGF-1 (insulin-like growth factor 1) level in the somatosensory cortex (Mysoet et al., 2014).

Present in many tissues, IGF-1 is a growth factor playing a key-role in the brain. Although it may be produced within the brain, the major part of its cerebral effects is due to IGF-1 produced by the liver and transported by the blood stream. Its entrance into the brain is activity-dependent since serum IGF-1 crosses the blood-brain-barrier specifically in activated brain areas (Nishijima et al., 2010). Several publications suggest that IGF-1 might mediate the beneficial effects of exercise on the brain (Carro et al., 2000; Ding et al., 2006; Llorens-Martín et al., 2010). Indeed, IGF-1 level is increased during exercise (Schwarz et al., 1996; see however Gatti et al. 2012); IGF-1 modulates neuronal excitability (Nuñez et al., 2003)

and dendritic growth (Niblock et al., 2000); it also affects the extent of cutaneous RFs in the dorsal column nuclei (Nuñez et al., 2003).

Given the adverse effects of HU on the somatosensory cortex organization, and the beneficial effects of IGF-1 on cortical plasticity, our hypothesis is that the decrease in IGF-1 observed in HU rats participates to the disorganization of the somatosensory cortex during HU. Thus, the question that arises is whether a restoration of the IGF-1 level in the somatosensory cortex could prevent the alteration induced by HU. Therefore, the first objective of the present study was to determine the effects of an IGF-1 infusion on the somatosensory cortex during the whole unloading period, by evaluating the size of the hindlimb representation in somatosensory cortex, the extent of receptive fields and the cutaneous sensibility threshold. The second objective was to evaluate the functional consequences of IGF-1 level restoration on tactile sensory discrimination.

Materials and methods

Ethics statement

All procedures described below were carried out in accordance with the European Communities Council Directive 2010/63/UE, and were approved by the Regional Committee on the Ethics of Animal Experiments of the Nord-Pas-de-Calais region (CEEA 75, reference Number: 02472.01). All efforts were made to minimize the number of animals and their suffering.

Animals

Male Wistar rats (280-320 g) were housed under temperature and light controlled conditions (23°C, 12-h light/12-h dark cycle). Rats were acclimated at least one week after their arrival to the animal facility. They had *ad libitum* access to food and water and were regularly handled. Body weight was monitored 3 days / week.

Hindlimb Unloading model

Hindlimb unloading was performed using the tail suspension model (Morey-Holton and Globus, 2002). The tail was surrounded with a hypoallergenic adhesive tape (Elastoplast)

and connected to a bracket, provided with a rotation of 360°. The height was adjusted to obtain a 30° inclination angle of the rat body with the horizontal. HU prevents the contact of the hindlimbs with the ground, whereas the rats are allowed to walk freely on their forelimbs. Control (C) and HU rats were housed in the same room. HU rats could have social interactions with their neighbors, and C animals were housed 3 per cage.

Chronic infusions of IGF-1

Two groups of rats (IGF-1 and HU-IGF-1) received a chronic infusion of IGF-1 (human IGF-1, 50 µg/mL; Peprtech) on the cerebral cortex. The infusion was achieved via a cannula attached with a flexible catheter to an osmotic minipump (200 µL reservoir, model 2002, Alzet), which ensures constant delivery of the substance for 2 weeks at the normal pumping rate of 0.48 µL/h. Pumps and catheters were primed by soaking in saline overnight. Implantation of the osmotic minipump was performed under strict aseptic conditions. The rats were anesthetized (ketamine 100 mg/kg, xylazine 20 mg/kg and acepromazine 3 mg/kg, i.p., Ceva Animal Health). Body temperature was maintained around 37°C with a heating pad. Lidocaine was applied on ear bars and the head was placed in a stereotaxic frame. A burr hole was performed on the right side of the skull at the point of cannula insertion (3.5 mm posterior to Bregma, 3 mm lateral), at a point estimated to be just posterior to the hindlimb cortical representation area. The cannula tip was not in contact with the brain, and was fixed on the skull with 3 screws and acrylic cement (TAB 2000, Kerr). The pump was placed subcutaneously on the back of the rat. The incision was closed with silk suture and antiseptic (Betadine®) was applied on incision zones. Rats were kept on a heating pad in a cage until they recovered consciousness. Some rats were sham-operated (C-Sham and HU-Sham) and received only vehicle (artificial cerebrospinal fluid composed of NaCl 117 mM; KCl 4.7 mM; CaCl₂ 2.5 mM; MgCl₂ 1.2 mM; NaH₂PO₄ 1.2 mM; NaHCO₃ 23 mM; glucose 10 mM). Rats were allowed to recover for one day before unloading.

Electrophysiological somatosensory mapping procedure

The electrophysiological mapping was performed on 33 rats (9 C, 12 HU, 5 IGF-1; 7 HU-IGF-1). The rats were anesthetized with sodium pentobarbital (60 mg/kg, i.p.). Animals of HU and HU-IGF1 groups were injected immediately after HU, and were not allowed to recover. If applicable, the acrylic cement block covering the cannula was removed cautiously. A craniotomy was performed to expose the region of the somatosensory cortex to be mapped. The dura mater was incised and resected. The cortex surface was bathed with warmed

physiologic serum to the prevent drying. Electrophysiological recordings were performed to determine the extent of the hindpaw representation on the somatosensory cortex, as previously described (Dupont et al., 2002). Briefly, multiunit recordings were performed with tungsten microelectrodes (10 M Ω) in layer IV (depth: 700-1200 μ m). The activity was amplified (x10k), filtered (bandwidth 0.3-10 kHz, model 1800 AC amplifier, AM-Systems), visualized on an oscilloscope, and delivered to an audio monitor. For each penetration site, the skin of the foot was hit with force-calibrated Semmes-Weinstein monofilaments (Stoelting Co.). If a light tactile stimulation of the hindpaw (<400 mg) specifically enhanced the neuronal activity, the recording site was considered as responsive; otherwise, it was considered as unresponsive. When responsive, the cutaneous RF and cutaneous sensibility threshold were determined. RF is defined as the paw region where tactile stimulation (400 mg) systematically enhanced neuronal activity, and threshold as the lowest stimulation force (8 - 20 - 40 - 70 - 160 mg) that enhanced neuronal activity. At the end of the mapping procedure, the cortical representation of the hindpaw was reconstructed by drawing boundaries to enclose the cortical sites responding to hindpaw stimulation. The hindpaw cortical area and the surface of the cutaneous RF were determined by using ImageJ software.

Mechanical withdrawal test

This experiment was performed on another group of 29 rats (7 C, 7 HU, 7 IGF-1, 8 HU-IGF-1). For the rats submitted to unloading (HU and HU-IGF-1 groups), the adhesive plaster was carefully removed under light isoflurane anesthesia. Animals were then housed individually. The withdrawal test was performed in the 6 h following reloading. The test was adapted from Pitcher et al. (1999). The rats were placed on an elevated testing cage with a customized platform made of plexiglass with 10 mm-diameter holes and a 15 mm-interaxial distance). Such a smooth surface was chosen to prevent any discomfort of the rat, and to reduce variability (Pitcher et al., 1999). The testing session began after 5 min, to allow exploration and grooming activities to cease. Mechanical stimulations were applied randomly on the plantar surface of the forepaw, or on the hindpaw (toes), with force-calibrated Semmes-Weinstein monofilaments (2 g for the forelimb and 8 g for the hindlimb) (Fig. 1). These filaments were chosen in a preliminary experiment so that they elicited withdrawal in 66% of the stimuli in control rats. Each surface of interest was stimulated 20 times and paw withdrawals were counted. If an ambiguous response occurred (i.e. in the case of ambulation or grooming), the trial was excluded. The total duration of the experiment was about 15 min. The percentage of paw withdrawal was determined before (D0) and after the 14-day period of HU and/or IGF-1 infusion (D14). Results are expressed as D14 minus D0 values.

Statistical analyses

Results are presented as mean \pm SEM. Normality was evaluated by Wilk's test. Statistical analysis (Student t-test) did not show any difference between Sham groups and non-operated C or HU ones. Thus, Sham and non-operated rats were pooled. For the evaluation of hindpaw cortical area and for the paw withdrawal test, a two-way analysis of variance (ANOVA) was used. Independent variables were *Group* (C vs. HU) and *Treatment* (ACSF vs. IGF-1). The Fisher test was used for post-hoc comparison. For threshold analysis, the 4 groups were first compared with a χ^2 test, and a pairwise comparison was then performed. For RF extent, groups were compared with the non-parametric Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-hoc test. A *p*-value of less than 0.05 was chosen as the significance level for all statistical analyses.

Results

Hindpaw somatotopic map

Figure 2 presents typical examples of the hindpaw cortical area for C, HU, IGF-1 and HU-IGF-1 rats (Fig. 2A), and the mean size of this area for the different groups (Fig. 2B). On average, 130 electrode penetrations were necessary to reconstruct the limits of the hindpaw area in C rats. The mean hindpaw cortical area was 1.95 ± 0.05 mm² in the C group. The two-way ANOVA showed a *treatment* effect ($F=28.82$, $p<0.001$) and a *suspension x treatment* interaction ($F=8.77$, $p<0.01$). A significant decrease was observed in the HU group (-21%, $p<0.05$). In contrast, IGF-1 had no effect on hindpaw representation (+17%, *ns*). Interestingly, when administered in HU rats, IGF-1 reversed the map shrinkage (HU vs. HU-IGF-1; +77%, $p<0.001$) and even enlarged the map with respect to C rats (C vs. HU-IGF-1 +38%, $p<0.001$).

Receptive Fields

Figure 3 presents typical cutaneous RFs and their mean size (in percentage of the full size of the hindpaw) for the different groups. For all groups, RFs extended over one single toe or one plantar pad, to the entire paw. However, the distribution varied among groups (Kruskal-Wallis: $H=51.70$, $p<0.001$). In the C rats, the RFs extended mostly over a few toes or a small part of the plantar surface. The mean size was 47% of the full size of the hindpaw. An

enlargement of RFs was observed after a period of HU (+68%, $p < 0.001$). In this group, the RFs often extended over the entire hindpaw. RF extent was very similar in IGF-1 and HU-IGF-1 groups. In both groups, RF extent is around 62% of the entire paw, and were then larger than in C group (+30%, $p < 0.05$), but smaller than in HU rats (-22%, $p < 0.01$). Thus, it appears that IGF-1 infusion affects RF extent. In addition, when administered during the unloading period, IGF-1 partially prevented the effects of HU.

Sensibility threshold

Cutaneous thresholds for evoking neuronal response were determined with a set of calibrated Semmes-Weinstein monofilaments from 8 to 400 mg. The χ^2 analysis performed on the 4 groups shows important changes after HU and/or IGF-1 ($\chi^2 = 60.05$, $p < 0.001$). In C rats, 47% of neurons were responsive to a tactile pressure of 70 mg applied on the plantar sole of the foot (Fig. 4). A few neurons were more responsive (up to 8 mg, 13%), other were less sensitive (more than 160 mg: 11%). HU condition and/or IGF-1 treatment were characterized by a dramatic increase in neuronal sensitivity: half of recorded neurons responded to application of 8 mg pressure, whereas around 15% only were responsive at 70 mg. Pairwise comparison reveals that all groups were different from the C one ($p < 0.001$), whereas no difference was detected between HU, IGF-1 and HU-IGF-1 groups. It is worth noting that the higher class (≥ 160 mg) was absent in rats that received infusion of IGF-1.

Mechanical withdrawal test

At D0, i.e. before unloading and IGF-1 administration, all groups had very similar values. For the forepaw, a withdrawal was observed for 60 to 73% of stimulations for all our groups. Similar results were observed for the toes (61 to 72%). A two-way ANOVA with *area* as within-effect and *group* and *treatment* as between effect showed no difference between the 4 groups.

Figure 5 presents the difference of response between D0 and D14. A two-way ANOVA with *area* as within-effect and *group* and *treatment* as between effect shows a *group* effect ($F = 5.36$, $p < 0.05$) and a *group x treatment* interaction ($F = 4.44$, $p < 0.05$). For the C group, data obtained on the forepaw and on the hindpaw were stable between D0 and D14 since the difference between these two days of testing was near 0. For the toes, HU rats lifted off their hindlimb less frequently than C rats ($p < 0.01$) or IGF-1 rats ($p < 0.05$). Moreover, values in HU-IGF-1 group were very close to that obtained in C group and were significantly different from

that of HU rats ($p < 0.05$). For the forelimb, the same pattern was observed, although not significant.

Discussion

We have investigated the effect of HU on somatosensory cortex and sensory discrimination, and determined whether IGF-1 administration during the whole unloading period could prevent deleterious effects of sensorimotor restriction. Our results confirm that HU has deleterious effects on somatosensory cortex, and that cortical changes are accompanied by functional alterations. In addition, they reveal that IGF-1 has beneficial effects on the somatosensory cortex of HU rats: IGF-1 completely prevents the map shrinkage and functional alterations, and partially the enlargement of RFs and the variation in cutaneous threshold. Interestingly, present data also demonstrate that when administered in control rats, IGF-1 affects RF extent and threshold, but has no effect on the hindlimb cortical map. Taken together, the data emphasize that IGF-1 plays a key-role in cortical plastic mechanisms.

Effect of HU and/or IGF-1 on the cortical map

Plasticity of somatosensory cortical representation is driven by (1) a change in peripheral activity, (2) in combination with permissive factors (Dykes, 1997). As already described, when rats are submitted to a sensorimotor restriction by means of HU (Dupont et al., 2003; Langlet et al., 1999) or by casting of forelimb (Coq and Xerri, 1999), the areal extent of the cutaneous map of the affected limb(s) decreases. The permissive state is a change in the balance of excitation and inhibition; it might involve muscarinic (Dupont et al., 2002) and NMDA receptors (Rosselet et al., 2006), since blockade of these receptors disrupts the reorganization of the somatotopic area after selective deafferentation (Dupont et al., 2002; Kano et al., 1991).

Chronic IGF-1 infusion in control rats does not significantly affect the topographic cortical map. This is a logical result since the animal behavior, and thus its sensorimotor experience, is not affected by IGF-1 infusion. The first condition to observe a cortical reorganization, i.e. change in peripheral activity, is thus not encountered.

In the HU-IGF-1 group, we have shown that IGF-1 prevented the cortical shrinkage, hindlimb area being even larger than in C rats. By which mechanism IGF-1 modulates the action of

HU remains to be determined. IGF-1 is known to modulate neuronal plasticity by acting at many levels, and it appears that HU and IGF-1 share many common molecular mechanisms. For instance, IGF-1 regulates glutamate receptors and synthesis and release of neurotransmitters such as acetylcholine, two neurotransmitters which are known to be involved in activity-dependent cortical plasticity. In addition, cortical reorganization during HU depends on activation of MAPK signaling pathway (Dupont et al., 2011), whereas IGF-1 action in the brain is mediated mainly by the PI3K/AKT signaling pathway, but also, although to a lesser extent, by the MAPK pathway (Bondy and Cheng, 2004). Previous studies have also demonstrated that HU affects some trophic factors. It increases NGF and BDNF mRNA levels (Dupont et al., 2005), and decreases IGF-1 level (Mysoet et al., 2014). As for IGF-1, it plays a central role in the regulation of neurotrophic factors such as BDNF (Ding et al., 2006; Fernandez and Torres-Alemán, 2012; Torres-Aleman, 2010). On current knowledge, by which molecular mechanism IGF-1 impacts shrinkage of cortical maps during HU is hard to say and we cannot exclude a combination of factors.

Effect of HU and/or IGF-1 on RFs

As exposed above, IGF-1 infusion in control rats has no effect on the map, but on the other hand, it produces an enlargement of RFs. This result indicates that mechanisms controlling the shrinkage of the somatotopic maps and the reorganization of the RFs are different, as previously suggested (Dupont et al., 2011; Rosselet et al., 2006).

An increase in the extent of RFs of somatosensory neurons is reported in HU rats as well as in rats cortically infused with IGF-1. This latter observation confirms results of Nuñez et al. (2003), who also demonstrated that systemic administration of IGF-1 increased the size of RFs in dorsal column nucleus neurons. Rosselet et al. (2006) suggest that RF size is correlated to GABA levels: the level of glutamic acid decarboxylase, a GABA synthesizing enzyme, is up-regulated when RFs get smaller and down-regulated when RFs return to normal. HU is known to decrease the GABA level within the somatosensory cortex (Canu et al., 2006; D'Amelio et al., 1996). In the same way, an exogenous administration of IGF-1 in the adult visual cortex induces a marked reduction of intracortical GABA levels (Maya-Vetencourt et al., 2012). Then, the enlargement of RFs induced by HU and/or IGF-1 might be mediated by a reduction in GABA level.

However, if enlargement of RFs is sustained by similar mechanisms in both groups (HU and IGF-1), the fact that IGF-1 partially prevents the effect of HU (the value in the HU-IGF-1 is lower than in HU group) is unexpected. This effect could be due to a modulation of GABA

receptors by IGF-1. Indeed, within the central nervous system, insulin increases expression of GABA_A receptors (Wan et al., 1997). Insulin and IGF-1 receptors share a very similar structure, and IGF-1 can activate insulin receptor with low affinity (De Meyts, 2004). Since IGF-1 concentration administered by the osmotic minipump is far higher than brain natural concentration, we can assume that IGF-1 also bind to insulin receptors and thus increased GABA_A receptor expression. In addition, binding of IGF-1 on its receptor activates the downstream signaling pathway PI3K/AKT. In turn, AKT-mediated phosphorylation increases the number of GABA_A receptors on the membrane surface (Wang et al., 2003). This up-regulation of GABA_A receptors might counteract the reduction in neurotransmitter level and partially counteract the effects of HU. Since we previously demonstrated that AKT activation is decreased in somatosensory cortex of HU rats (Mysoet et al., 2014), IGF-1 might prevent the enlargement of RFs through its action on GABA receptors and AKT pathway. However, whether this signaling pathway is involved in RF tuning remains to be determined.

Effect of HU and/or IGF-1 on sensibility threshold of cortical neurons

The force necessary to enhanced neuronal activity was lower in IGF-1 group than in the C one. The cutaneous stimulation-induced response reflects changes in cortical excitability. As a matter of fact, IGF-1 is known to increase sensitivity to afferent stimulation (Carro et al., 2000) and to modify the electrophysiological properties of neurons (Nuñez et al., 2003; Xing et al., 2007). Surprisingly, although both HU and IGF-1 strongly decrease the threshold, we did not observe any cumulative effect in the HU-IGF-1 group. In other words, IGF-1 did not exacerbate the effects of HU. This result can be explained by the fact that the finest available filament applies a force of 8 mg. Maybe some neurons were responsive to lower thresholds, but we cannot identify their proportion.

Effect of HU and/or IGF-1 on the paw withdrawal test

In our work, the electrophysiological procedure was combined with a test, namely the paw withdrawal test. HU induced a functional alteration, i.e. light tactile stimulations elicited less withdrawal in HU rats, whereas cortical neurons were activated at a lower threshold with the electrophysiological procedure. In addition, IGF-1 had a preventive action in the behavioral test, but not in the electrophysiological study. This apparent discrepancy between 'electrophysiological' and 'behavioral' thresholds can be explain be the fact that the withdrawal test involves not only tactile sensation, but also other components, such as proprioceptive sensation, motor capacity and attention. Thus, we cannot conclude from this

observation that IGF-1 has a specific effect on tactile sensation, but other factors might participate to the preventive effect of this substance.

First, pressure applied on the paw for the withdrawal test (2 g for the forepaw, 8 g for the hindpaw) is far above those used for RF and threshold determination (max 400 mg). The latter test involves specifically tactile receptors, whereas the former activates deep proprioceptive receptors.

Failure to remove the paw in HU rats might be explained by an inability to withdraw the paw due to a postural instability and an impaired body support. Indeed, HU induces an atrophy of postural muscles (for a review, Flück and Hoppeler 2003), and a trunk instability (Canu and Falempin, 1996), making the transfer of body weight on one limb for paw withdrawal difficult. Whether IGF-1 infusion in the brain might prevent motor impairments is unknown. However, IGF-1 increases BDNF level (Carro et al., 2000), and in turn, BDNF is known to enhance long-term functional neurological outcome after cerebral ischemia (Ploughman et al., 2009; Schäbitz et al., 2007).

Distraction is another inherent limitation of the mechanical withdrawal test, since the rat can move its attention to another object than the paw. In our touch test, response can be limited to a short focalization of attention towards the paw without withdrawal. Such a response is sometimes difficult to detect and thus was not taken into account. However, measuring the time to detect the adhesive tape in the adhesive removal test (Bouet et al., 2009) revealed no difference between groups (Mysoet et al., unpublished data). Thus, it seems very unlikely that the alteration in behavioral task observed in the present study might be attributable to a deficit in attentional processes.

Functional implications and conclusion

To what extent do results obtained in HU rats are relevant to other forms of sensorimotor manipulation, in particular in humans? Whether bed rest or limb immobilization affects somatotopic representation on the somatosensory cortex is unknown. On the other hand, a few studies have reported a change in cortical excitability following immobilization of one limb or fingers by casting. They all show that arm immobilization decreases substantially cortical activation over the contralateral cortex, and reduces tactile discrimination of the immobilized hand (Huber et al., 2006; Lissek et al., 2009; Weibull et al., 2011). In addition, compensatory effects were found on the contralateral, healthy hand (Lissek et al., 2009; Weibull et al., 2011), probably resulting from transcallosal connections between left and right cortices. This observation is in agreement with data obtained in the rat by Coq and Xerri (1999) after

forepaw casting. In their study, the response to cutaneous stimulation of the casted forepaw was weaker, whereas the response to the non casted limb was stronger. At contrast, present data provide evidence for a decrease in neuronal activation thresholds in HU rats. This discrepancy might be explained by the fact that casting affects one single limb; at the opposite, during HU, immobility occurs in both hindlimbs simultaneously. Thus, upper limb immobilization is not relevant to understand what occurs during all situations of disuse, in particular during bed rest. HU is a useful model to understand cortical plasticity occurring in patients who have undergone a prolonged confinement to bed, and further studies in human are necessary to understand functional significance of these changes.

To conclude, the present study demonstrates that IGF-1 plays a role in the dynamic control of reorganization somatotopic maps and in the maintenance of behavior. Tactile abilities is often correlated with the areal extent of S1 cortex paw representation (see for Martinez et al., 2009; Tegenthoff et al., 2005; Xerri et al., 2005). However, whether sensory processing is directly related to topographic maps is still a matter of debate. In view of the well established role of IGF-1 in neurodegenerative pathologies such as Alzheimer disease (de la Monte and Wands, 2005; Westwood et al., 2014), understanding how this molecule acts to prevent consequences of hypoactivity might bring major potential therapeutic applications.

Aknowledgements

The present research work has been supported by the Centre National d'Etudes Spatiales (CNES). The authors would like to thank Dr J.O. Coq for his thoughtful consideration of this manuscript prior to its submission for publication.

References

- Bondy, C. a., Cheng, C.M., 2004. Signaling by insulin-like growth factor 1 in brain. *Eur. J. Pharmacol.* doi:10.1016/j.ejphar.2004.02.042
- Bouet, V., Boulouard, M., Toutain, J., Divoux, D., Bernaudin, M., Schumann-Bard, P., Freret, T., 2009. The adhesive removal test: a sensitive method to assess sensorimotor deficits in mice. *Nat. Protoc.* 4, 1560–1564. doi:10.1038/nprot.2009.125
- Canu, M.H., Falempin, M., 1996. Effect of hindlimb unloading on interlimb coordination during treadmill locomotion in the rat. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* 78, 509–515. doi:10.1007/s004210050453
- Canu, M.H., Garnier, C., 2009. A 3D analysis of fore- and hindlimb motion during overground and ladder walking: Comparison of control and unloaded rats. *Exp. Neurol.* 218, 98–108. doi:10.1016/j.expneurol.2009.04.009
- Canu, M.H., Stevens, L., Falempin, M., 2007. Effect of hindlimb suspension on activation and MHC content of triceps brachii and on the representation of forepaw on the sensorimotor cortex. *Exp. Neurol.* 203, 521–530. doi:10.1016/j.expneurol.2006.09.005
- Canu, M.H., Treffort, N., Picquet, F., Dubreucq, G., Guerardel, Y., Falempin, M., 2006. Concentration of amino acid neurotransmitters in the somatosensory cortex of the rat after surgical or functional deafferentation. *Exp. Brain Res.* 173, 623–628. doi:10.1007/s00221-006-0401-2
- Carro, E., Nuñez, A., Busiguina, S., Torres-Aleman, I., 2000. Circulating insulin-like growth factor I mediates effects of exercise on the brain. *J. Neurosci.* 20, 2926–2933. doi:10.1016/j.tins.2006.06.011
- Clark, B.C., Manini, T.M., Bolanowski, S.J., Ploutz-Snyder, L.L., 2006. Adaptations in human neuromuscular function following prolonged unweighting: II. Neurological properties and motor imagery efficacy. *J. Appl. Physiol.* 101, 264–272. doi:10.1152/jappphysiol.01404.2005
- Coq, J.O., Xerri, C., 1999. Tactile impoverishment and sensorimotor restriction deteriorate the forepaw cutaneous map in the primary somatosensory cortex of adult rats. *Exp. Brain Res.* 129, 518–531. doi:10.1007/s002210050922
- D'Amelio, F., Fox, R. a., Wu, L.C., Dauntou, N.G., 1996. Quantitative changes of GABA-immunoreactive cells in the hindlimb representation of the rat somatosensory cortex after 14-day hindlimb unloading by tail suspension. *J. Neurosci. Res.* 44, 532–539. doi:10.1002/(SICI)1097-4547(19960615)44:6<532::AID-JNR3>3.0.CO;2-C
- De la Monte, S.M., Wands, J.R., 2005. Review of insulin and insulin-like growth factor expression, signaling, and malfunction in the central nervous system: relevance to Alzheimer's disease. *J. Alzheimers. Dis.* 7, 45–61.
- De Meyts, P., 2004. Insulin and its receptor: Structure, function and evolution. *BioEssays.* doi:10.1002/bies.20151
- Ding, Q., Vaynman, S., Akhavan, M., Ying, Z., Gomez-Pinilla, F., 2006. Insulin-like growth factor I interfaces with brain-derived neurotrophic factor-mediated synaptic plasticity to

- modulate aspects of exercise-induced cognitive function. *Neuroscience* 140, 823–833. doi:10.1016/j.neuroscience.2006.02.084
- Dupont, E., Canu, M.H., Falempin, M., 2002. Atropine prevents the changes in the hindlimb cortical area induced by hypodynamia-hypokinesia. *Brain Res.* 926, 51–57. doi:10.1016/S0006-8993(01)03293-0
- Dupont, E., Canu, M.H., Falempin, M., 2003. A 14-day period of hindpaw sensory deprivation enhances the responsiveness of rat cortical neurons. *Neuroscience* 121, 433–439. doi:10.1016/S0306-4522(03)00494-9
- Dupont, E., Canu, M.H., Langlet, C., Falempin, M., 2001. Time course of recovery of the somatosensory map following hindpaw sensory deprivation in the rat. *Neurosci. Lett.* 309, 121–124. doi:10.1016/S0304-3940(01)02050-X
- Dupont, E., Canu, M.H., Stevens, L., Falempin, M., 2005. Effects of a 14-day period of hindpaw sensory restriction on mRNA and protein levels of NGF and BDNF in the hindpaw primary somatosensory cortex. *Mol. Brain Res.* 133, 78–86. doi:10.1016/j.molbrainres.2004.09.019
- Dupont, E., Stevens, L., Cochon, L., Falempin, M., Bastide, B., Canu, M.H., 2011. Erk is involved in the reorganization of somatosensory cortical maps in adult rats submitted to hindlimb unloading. *PLoS One* 6. doi:10.1371/journal.pone.0017564
- Dykes, R.W., 1997. Mechanisms controlling neuronal plasticity in somatosensory cortex. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 75, 535–545. doi:10.1139/y97-089
- Fernandez, A.M., Torres-Alemán, I., 2012. The many faces of insulin-like peptide signalling in the brain. *Nat. Rev. Neurosci.* doi:10.1038/nrn3209
- Flück, M., Hoppeler, H., 2003. Molecular basis of skeletal muscle plasticity--from gene to form and function. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 146, 159–216. doi:10.1007/s10254-002-0004-7
- Fortney, S.M., Schneider, V.S., Greenleaf, J.E., 1996. The physiology of bed rest, Supplement 14: Handbook of Physiology, Environmental Physiology. doi:10.1002/cphy.cp040251
- Gatti, R., De Palo, E.F., Antonelli, G., Spinella, P., 2012. IGF-I/IGFBP system: metabolism outline and physical exercise. *J. Endocrinol. Invest.* 35, 699–707. doi:10.3275/8456
- Huber, R., Ghilardi, M.F., Massimini, M., Ferrarelli, F., Riedner, B. a, Peterson, M.J., Tononi, G., 2006. Arm immobilization causes cortical plastic changes and locally decreases sleep slow wave activity. *Nat. Neurosci.* 9, 1169–1176. doi:10.1038/nn1758
- Kano, M., Iino, K., Kano, M., 1991. Functional reorganization of adult cat somatosensory cortex is dependent on NMDA receptors. *Neuroreport* 2, 77–80. doi:10.1097/00001756-199102000-00003
- Langlet, C., Canu, M.H., Falempin, M., 1999. Short-term reorganization of the rat somatosensory cortex following hypodynamia-hypokinesia. *Neurosci. Lett.* 266, 145–148. doi:10.1016/S0304-3940(99)00296-7

- Lissek, S., Wilimzig, C., Stude, P., Pleger, B., Kalisch, T., Maier, C., Peters, S. a., Nicolas, V., Tegenthoff, M., Dinse, H.R., 2009. Immobilization Impairs Tactile Perception and Shrinks Somatosensory Cortical Maps. *Curr. Biol.* 19, 837–842. doi:10.1016/j.cub.2009.03.065
- Llorens-Martín, M., Torres-Alemán, I., Trejo, J.L., 2010. Exercise modulates insulin-like growth factor 1-dependent and -independent effects on adult hippocampal neurogenesis and behaviour. *Mol. Cell. Neurosci.* 44, 109–117. doi:10.1016/j.mcn.2010.02.006
- Martinez, M., Brezun, J.M., Zennou-Azogui, Y., Baril, N., Xerri, C., 2009. Sensorimotor training promotes functional recovery and somatosensory cortical map reactivation following cervical spinal cord injury. *Eur. J. Neurosci.* 30, 2356–2367. doi:10.1111/j.1460-9568.2009.07019.x
- Maya-Vetencourt, J.F., Baroncelli, L., Viegi, A., Tiraboschi, E., Castren, E., Cattaneo, A., Maffei, L., 2012. IGF-1 restores visual cortex plasticity in adult life by reducing local GABA levels. *Neural Plast.* 2012. doi:10.1155/2012/250421
- Morey-Holton, E.R., Globus, R.K., 2002. Hindlimb unloading rodent model: technical aspects. *J. Appl. Physiol.* 92, 1367–1377. doi:10.1152/jappphysiol.00969.2001
- Mysoet, J., Canu, M.-H., Cieniewski-Bernard, C., Bastide, B., Dupont, E., 2014. Hypoactivity Affects IGF-1 Level and PI3K/AKT Signaling Pathway in Cerebral Structures Implied in Motor Control. *PLoS One* 9, e107631. doi:10.1371/journal.pone.0107631
- Niblock, M.M., Brunso-Bechtold, J.K., Riddle, D.R., 2000. Insulin-like growth factor I stimulates dendritic growth in primary somatosensory cortex. *J. Neurosci.* 20, 4165–4176.
- Nishijima, T., Piriz, J., Dufлот, S., Fernandez, A.M., Gaitan, G., Gomez-Pinedo, U., Verdugo, J.M.G., Leroy, F., Soya, H., Nuñez, A., Torres-Aleman, I., 2010. Neuronal Activity Drives Localized Blood-Brain-Barrier Transport of Serum Insulin-like Growth Factor-I into the CNS. *Neuron* 67, 834–846. doi:10.1016/j.neuron.2010.08.007
- Nuñez, A., Carro, E., Torres-Aleman, I., 2003. Insulin-like growth factor I modifies electrophysiological properties of rat brain stem neurons. *J. Neurophysiol.* 89, 3008–3017. doi:10.1152/jn.00089.2003
- Pitcher, G.M., Ritchie, J., Henry, J.L., 1999. Paw withdrawal threshold in the von Frey hair test is influenced by the surface on which the rat stands. *J. Neurosci. Methods* 87, 185–193. doi:10.1016/S0165-0270(99)00004-7
- Ploughman, M., Windle, V., MacLellan, C.L., White, N., Doré, J.J., Corbett, D., 2009. Brain-derived neurotrophic factor contributes to recovery of skilled reaching after focal ischemia in rats. *Stroke* 40, 1490–1495. doi:10.1161/STROKEAHA.108.531806
- Roberts, D.R., Ramsey, D., Johnson, K., Kola, J., Ricci, R., Hicks, C., Borckardt, J.J., Bloomberg, J.J., Epstein, C., George, M.S., 2010. Cerebral cortex plasticity after 90 days of bed rest: Data from TMS and fMRI. *Aviat. Sp. Environ. Med.* 81, 30–40. doi:10.3357/ASEM.2532.2009
- Rosselet, C., Zennou-Azogui, Y., Xerri, C., 2006. Nursing-induced somatosensory cortex plasticity: temporally decoupled changes in neuronal receptive field properties are

- accompanied by modifications in activity-dependent protein expression. *J. Neurosci.* 26, 10667–10676. doi:10.1523/JNEUROSCI.3253-06.2006
- Schäbitz, W.R., Steigleder, T., Cooper-Kuhn, C.M., Schwab, S., Sommer, C., Schneider, A., Kuhn, H.G., 2007. Intravenous brain-derived neurotrophic factor enhances poststroke sensorimotor recovery and stimulates neurogenesis. *Stroke* 38, 2165–2172. doi:10.1161/STROKEAHA.106.477331
- Schwarz, A.J., Brasel, J.A., Hintz, R.L., Mohan, S., Cooper, D.M., 1996. Acute effect of brief low- and high-intensity exercise on circulating insulin-like growth factor (IGF) I, II, and IGF-binding protein-3 and its proteolysis in young healthy men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81, 3492–3497. doi:10.1210/jc.81.10.3492
- Tegenthoff, M., Ragert, P., Pleger, B., Schwenkreis, P., Förster, A.F., Nicolas, V., Dinse, H.R., 2005. Improvement of tactile discrimination performance and enlargement of cortical somatosensory maps after 5 Hz rTMS. *PLoS Biol.* 3, 2031–2040. doi:10.1371/journal.pbio.0030362
- Torres-Aleman, I., 2010. Toward a comprehensive neurobiology of IGF-I. *Dev. Neurobiol.* doi:10.1002/dneu.20778
- Viguié, M., Dupui, P., Montoya, R., 2009. Posture analysis on young women before and after 60 days of -6?? head down bed rest (Wise 2005). *Gait Posture* 29, 188–193. doi:10.1016/j.gaitpost.2008.08.001
- Wan, Q., Xiong, Z.G., Man, H.Y., Ackerley, C. a, Branton, J., Lu, W.Y., Becker, L.E., MacDonald, J.F., Wang, Y.T., 1997. Recruitment of functional GABA(A) receptors to postsynaptic domains by insulin. *Nature* 388, 686–690. doi:10.1038/41792
- Wang, Q., Liu, L., Pei, L., Ju, W., Ahmadian, G., Lu, J., Wang, Y., Liu, F., Wang, Y.T., 2003. Control of synaptic strength, a novel function of Akt. *Neuron* 38, 915–928. doi:10.1016/S0896-6273(03)00356-8
- Weibull, A., Flondell, M., Rosén, B., Björkman, A., 2011. Cerebral and clinical effects of short-term hand immobilisation. *Eur. J. Neurosci.* 33, 699–704. doi:10.1111/j.1460-9568.2010.07551.x
- Westwood, A.J., Beiser, A., Decarli, C., Harris, T.B., Chen, T.C., He, X.-M., Roubenoff, R., Pikula, A., Au, R., Braverman, L.E., Wolf, P. a, Vasani, R.S., Seshadri, S., 2014. Insulin-like growth factor-1 and risk of Alzheimer dementia and brain atrophy. *Neurology* 82, 1613–9. doi:10.1212/WNL.0000000000000382
- Xerri, C., Bourgeon, S., Coq, J.O., 2005. Perceptual context-dependent remodeling of the forepaw map in the SI cortex of rats trained on tactile discrimination. *Behav. Brain Res.* 162, 207–221. doi:10.1016/j.bbr.2005.03.003
- Xing, C., Yin, Y., Chang, R., Gong, X., He, X., Xie, Z., 2007. Effects of insulin-like growth factor 1 on synaptic excitability in cultured rat hippocampal neurons. *Exp. Neurol.* 205, 222–229. doi:10.1016/j.expneurol.2007.01.029

Figure legends

Figure 1: Representation of the plantar surfaces tested in the mechanical withdrawal test. Mechanical pressures of 2 g were applied on the forepaw, and 8 g on the hindpaw.

Figure 2: Effect of HU and/or IGF-1 on functional organization of the somatosensory cortex. A. Typical maps presenting hindpaw cortical areas. ○ and ● indicate recording sites where neurons were respectively responsive or unresponsive to hindpaw cutaneous stimulation. The map area, expressed in mm², is indicated below. B. Box and whisker plots showing the median (horizontal bar), quartiles (box), and extreme values (whiskers) of the hindpaw cortical area for C, HU, IGF-1 and HU-IGF-1 groups. * and ** indicate a significant difference with respect to C group ($p < 0.05$ and $p < 0.01$ respectively), ## and ### with respect to HU group ($p < 0.01$ and $p < 0.001$ respectively).

Figure 3: Effect of HU and/or IGF-1 on cutaneous receptive fields. RFs are expressed as a percentage of the full size of the hindpaw. A. Illustration of 4 typical cutaneous RFs for each group. Only the ventral surface (glabrous skin) of the hindpaw is presented. Value is the mean size (in percentage of the full size of the hindpaw) for each group. B. Box and whisker plots showing the median (horizontal bar), quartiles (box), and extreme values (whiskers) of the RF extent for C, HU, IGF-1 and HU-IGF1 groups. ** and *** indicate a significant difference with respect to C group ($p < 0.01$ and $p < 0.001$ respectively), # and ### with respect to HU group ($p < 0.05$ and $p < 0.001$ respectively).

Figure 4: Effect of HU and/or IGF-1 on sensibility threshold. Cutaneous threshold were determined with Semmes-Weinstein filament (8–160 mg) at each cortical mapping site. Boxes present the distribution of the sensibility threshold for C, HU, IGF-1 and HU-IGF1 groups.

Figure 5: Effect of HU and/or IGF-1 on foot withdrawal. The percentage of response was measured before HU and/or IGF-1 infusion (D0) and after 14 days (D14). Histograms represent the difference between D14 and D0. ** indicates a significant difference with respect to C group ($p < 0.01$), # with respect to HU group ($p < 0.05$).

Figure

Figure 1

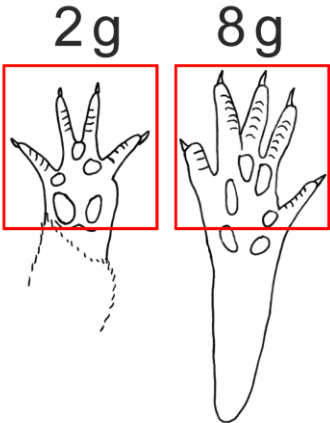


Figure 2

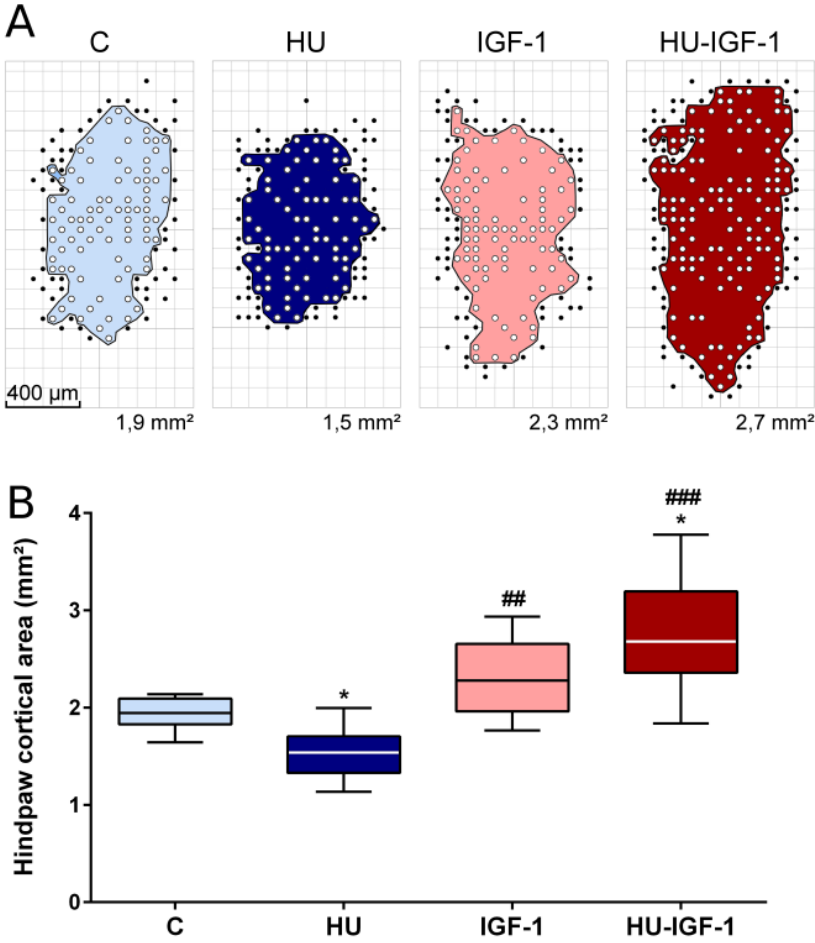


Figure 3

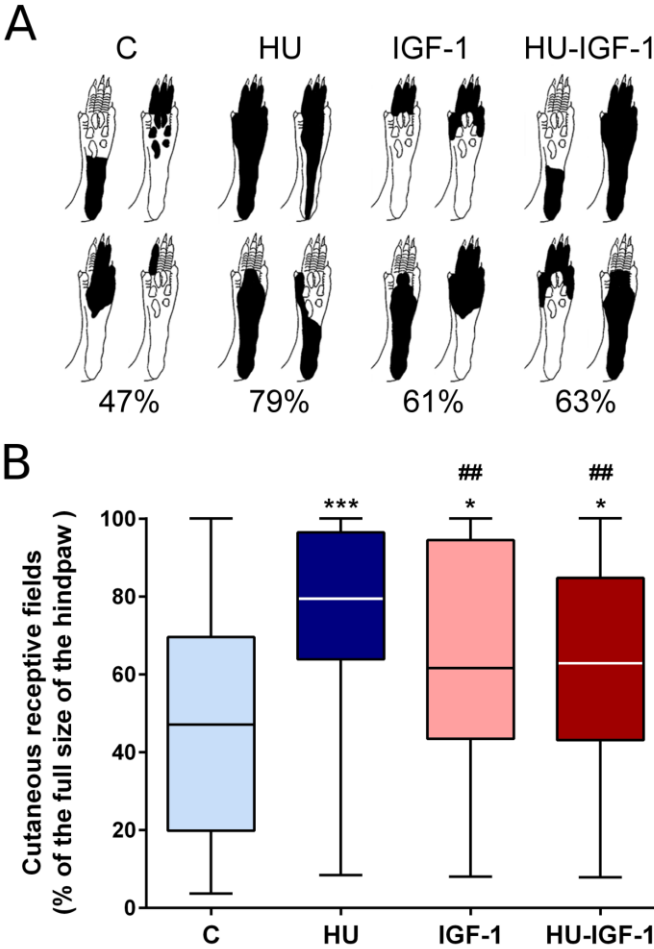


Figure 4

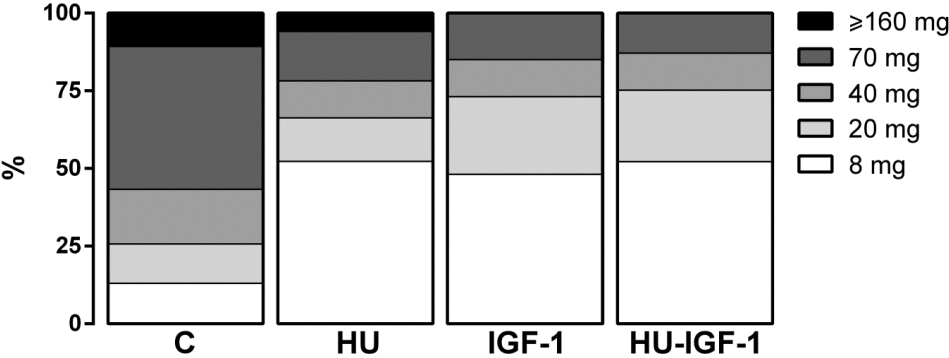
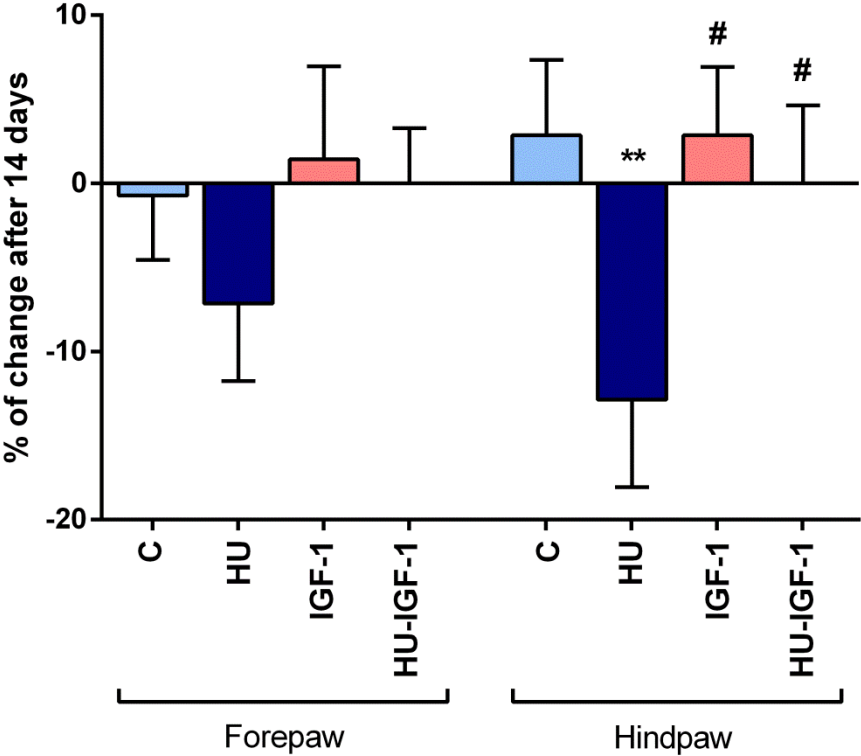


Figure 5



REORGANIZATION OF MOTOR CORTEX AND DEGRADATION OF MOTOR PERFORMANCE INDUCED BY HINDLIMB UNLOADING ARE ALLEVIATED BY CORTICAL IGF-1 ADMINISTRATION

Julien MYSOET, Marie-Hélène CANU, Bruno BASTIDE, Erwan DUPONT

Université Lille Nord de France, F-59000 Lille, France

Unité de recherche pluridisciplinaire sport, santé, société, EA 7369, IFR 114, Université Lille 1, Sciences et Technologies, F-59650 Villeneuve d'Ascq, France

E-Mail addresses

julien.mysoet@univ-lille1.fr
marie-helene.canu@univ-lille1.fr
bruno.bastide@univ-lille1.fr
erwan.dupont@univ-lille1.fr

Corresponding author

Erwan DUPONT
Laboratoire « Activité Physique, Muscle et Santé », EA 7369
Université Lille 1, Sciences et Technologies
Bâtiment SN4
F-59655 Villeneuve d'Ascq cedex
Telephone number: (33) 3 20 43 42 04
Fax number: (33) 3 20 43 68 88
E-mail address: erwan.dupont@univ-lille1.fr

Running title

IGF-1 alleviates consequences of disuse on motor cortex and motility

Key words

Disuse, cortical plasticity, motor performance

Key points summary

- Sensorimotor restriction affects organization of motor cortex and induces a degradation of motor performance.
- IGF-1 partially prevents cortical shrinkage and decrease of cortical excitability.
- IGF-1 prevents the degradation of spontaneous activity.
- IGF-1 has no beneficial effect on motor performance in a skilled motor task

Abstract

Immobilization, bed rest, or sedentary lifestyle are known to induce a profound impairment in sensorimotor performance. These alterations are due to a combination of peripheral and central factors. Previous data conducted on a rat model of disuse (hindlimb unloading, HU) have shown a profound reorganization of motor cortex and an impairment of motor tasks. Recently, our interest was turned towards the role of insulin-like growth factor 1 (IGF-1) in cerebral plasticity since this growth factor is considered as the mediator of beneficial effects of exercise on the brain, and its cortical level is decreased after a 14-day period of HU. In the present study, we attempted to determine whether a chronic cortical administration of IGF-1 in HU rats could prevent deleterious effects of HU on the motor cortex and on motor activity. We demonstrated that HU induces a shrinkage of hindlimb cortical representation (-50%, $p < 0.001$) and an increase in current threshold to elicit a movement (+17% for the hip, $p < 0.001$). Administration of IGF-1 in HU rats partially prevents the map shrinkage and the increase in threshold (-29%, $p < 0.05$, and -2%, n.s., with respect to control, respectively). With regard to the functional evaluation, IGF-1 prevents the decrease in spontaneous activity found in HU rats (HU: -38%, $p < 0.01$; HU-IGF-1: -11%, n.s.). In contrast, it has no beneficial effect on a skilled motor task (ladder walking). Taken together, these data clearly indicate the implication of IGF-1 in cortical plastic mechanisms and in behavioral alteration induced by a decreased in sensorimotor activity.

Abbreviations

BDNF: brain derived neurotrophic factor; C : control ; GABA : γ -aminobutyric acid ; HU : hindlimb unloading ; IGF-1 : insulin-like growth factor 1

Introduction

In human, a chronic reduction in neuromuscular activity results in a profound impairment of the motor tasks performance. Indeed, prolonged bed-rest, lower limb immobilization, ageing or spaceflight, strongly affect posture, gait and functional mobility (Fortney *et al.*, 1996; Viguier *et al.*, 2009; Roberts *et al.*, 2010). According to Clark and collaborators (2006), these impairments arise from a combination of muscular and neural factors. In terms of the relative contribution of neural and muscular factors regulating strength loss, neural and mainly supraspinal factors explain 48% of the strength loss. However, our understandings of these mechanisms are still limited.

The rat hindlimb unloading (HU) model is commonly used to improve our understanding of the effects of disuse (Morey-Holton & Globus, 2002). During HU, the rat hindlimbs are elevated; this elevation results in a suppression of the weight exerted on the hindlimbs and a decrease in motor activity. It has been shown that a 14-day period of HU induces profound abnormalities in the postural and locomotor tasks (Canu *et al.*, 2007; Canu & Garnier, 2009). These changes in motor performance involve factors located at several levels of the motor pathway. First, HU induces a degradation of the muscular system (atrophy, loss of strength, phenotypic changes), which is muscle specific and more pronounced in postural muscles (Thomason & Booth, 1990). Such muscular changes might have repercussions on movement realization. However, it seems to have only a low impact, since restoration of muscle force by administration of an anabolic substance has no effect on the locomotor performance (Canu *et al.*, 2001). In addition, movements are less stereotyped in HU rats, suggesting that some aspects of the locomotor synergy are organized at a supraspinal level (Canu *et al.*, 2005). In the brain, execution of movement is mainly organized by the motor cortex (for review Georgopoulos & Carpenter, 2015). Langlet and collaborators (2012) have described a profound alteration of the organization of the motor cortex and a strong decrease in cortical excitability following HU. These changes in the motor cortex of HU rats might participate to the alteration in motor performance.

Recently, our interest was turned toward the role of insulin-like growth factor 1 (IGF-1) in the neuronal plastic mechanisms induced by HU. Indeed, we have shown that the decrease in sensorimotor activity in HU rats is accompanied by a decrease in IGF-1 level in the sensorimotor cortex (Mysoet *et al.*, 2014). Produced in many tissues but mostly by the liver, IGF-1 is a growth factor playing a key-role in the brain, whose entrance into the brain is activity-dependent (Nishijima *et al.*, 2010). Moreover, several publications suggest that IGF-1 might mediate the beneficial effects of exercise on the brain (Carro *et al.*, 2000; Ding *et al.*,

2006; Llorens-Martín *et al.*, 2010). Finally, it appears that IGF-1 administration prevents some of the effect of HU on somatosensory cortex (Mysoet *et al.*, 2015).

Given the adverse effects of HU on the somatosensory cortex organization, and the beneficial effects of IGF-1 on cortical plasticity, our hypothesis is that the decrease in IGF-1 level observed in HU rats participates to the disorganization of the motor cortex during HU. Thus, the question that arises is whether a restoration of the IGF-1 level in the motor cortex could prevent the alterations induced by HU. Therefore, the first objective of the present study was to determine the effects of an IGF-1 infusion on the cortex during the whole unloading period, by evaluating the size of the hindlimb representation in motor cortex and the lowest current necessary to induce a movement. The second objective was to evaluate the functional consequences of IGF-1 level restoration on the motor performance by evaluating the skilled motor activity (ladder rung walking test) and the general motor activity by means of actimeters.

Materials and methods

Animals and ethics statement

All procedures described below were carried out in accordance with the European Communities Council Directive 2010/63/UE, and were approved by the Regional Committee on the Ethics of Animal Experiments of the Nord-Pas-de-Calais region (CEEA 75, Reference Number: 02472.01). All efforts were made to minimize the number of animals and their suffering.

Male wistar rats (280-320 g) (Harlan, France) were housed under temperature and light controlled conditions (23°C, 12-h light/12-h dark cycle). Body weight was monitored 3 days / week. Rats were acclimated at least one week after their arrival to the animal facility. They were regularly handled. They had *ad libitum* access to food and water. Rats were assigned randomly to one group: control (C), hindlimb unloaded (HU), infusion of IGF-1 (IGF-1) or hindlimb unloaded with infusion of IGF-1 (HU-IGF-1).

Hindlimb Unloading model

Hindlimb unloading was performed using the tail suspension model (Morey-Holton & Globus, 2002). The rat tail was washed, surrounded with a hypoallergenic adhesive tape

(Elastoplast), and then connected to a bracket which ensures a rotation of 360°. The height was adjusted to obtain a 30° inclination angle of the rat body with the horizontal. This situation prevented the contact of the hindlimbs with the ground, whereas the rats were allowed to walk freely on their forelimbs. 'Ground' (C and IGF-1 groups) and unloaded rats (HU and HU-IGF-1 groups) were housed in the same room. HU rats could have social interactions with their neighbors, and C rats were housed with 2 other rats.

Chronic infusions of IGF-1

Twenty-seven rats (12 for the mapping procedure and 15 for the behavioral tests) received a chronic infusion of IGF-1 (human IGF-1, 50 µg/mL; Peprotech) on the cerebral cortex. The infusion was achieved via a cannula attached with a flexible catheter to an osmotic minipump (200 µL reservoir, model 2002, Alzet), which permits a constant delivery of the substance for 2 weeks at the normal pumping rate of 0.48 µL/h. Pumps and catheters were primed by soaking in saline overnight. Implantation of the osmotic minipump was performed under strict aseptic conditions. The rats were anesthetized with isoflurane. Body temperature was maintained at 37°C with a heating pad. The head was placed in a stereotaxic frame. Lidocaine was applied on ear bars. A burr hole was performed on the right side of the skull at the point of cannula insertion (3.5 mm posterior to Bregma, 3 mm lateral), at a point estimated to be just posterior to the hindlimb cortical representation area. A small incision was made in the dura-mater; the cannula was positioned so that its extremity was not in contact with the brain, and was fixed on the skull with 3 screws and acrylic cement (TAB 2000, Kerr). The pump was placed subcutaneously on the back of the rat. The incision was closed with silk suture, and antiseptic (Betadine, Viatrix) was applied on incision zones. Rats were kept on a heating pad in a cage until they recovered consciousness. HU-IGF-1 rats were allowed to recover for one day before HU procedure. A group of rats was sham-operated and received only vehicle (artificial cerebrospinal fluid). Statistical analyses (Student t-test) did not show differences between sham-operated and non-operated rats. Thus, sham groups were pooled with non-operated ones.

Electrophysiological procedure

The electrophysiological mapping was performed on 39 rats (13 C; 14 HU; 5 IGF-1; 7 HU-IGF-1). The detailed procedure is described elsewhere (Langlet *et al.*, 2012). Briefly, the rats were anesthetized with a first injection of ketamine hydrochloride (70 mg/kg, i.p.), xylazine (5

mg/kg, i.p.) and with a second injection of ketamine hydrochloride (20 mg/kg, i.p.) and acepromazine (0.2 mg/kg, i.p.). Supplementary doses of the second injection were delivered as needed to suppress hindlimb withdrawal reflex. The body temperature was maintained at approximately 37 °C with a thermostatically controlled heating pad. The rat was placed in a stereotaxic apparatus. Lidocaine 2% was applied on ear bars and scalp incision line.

The cortex was exposed by making a craniotomy. The dura-mater was removed, and the cortex was covered with 37°C artificial cerebrospinal fluid. Monophasic cathodal pulses were delivered at a depth of approximately 1800 µm below cortical surface with platinum-iridium microelectrodes (tip diameter: 1–2 µm, impedance: 1 MΩ at 1 kHz, parylene insulated, PTM23B10, WPI). Electrode penetrations were placed in a grid-like fashion at 250 µm intervals. Stimulation consisted of 100 ms trains of 0.2 ms pulses (333 Hz) delivered at interval of 1 s from an electrically isolated, constant current stimulator (A300 Pulsemaster stimulator with A360 isolation unit, WPI). Animals were maintained in a prone position, with hindlimbs unsupported. Hindlimbs were regularly mobilized (flexion and extension in a stepping-like movement) to prevent muscle rigidity that limits the detection of movements. At each site, the stimulation was initiated at the lowest intensity (5 µA) and was progressively increased until a movement was evoked. Identification of joint movements was performed by visual inspection and palpation. At each penetration site, the minimal threshold required to elicit a movement of any joint of the hindlimb was recorded. This minimal current intensity was defined as “absolute threshold”. Then, current intensity was gradually increased until a movement of a specific hindlimb joint (hip, knee, ankle or toes) was detected. This second intensity was considered as “relative threshold”. Penetration sites that failed to elicit a movement of the hindlimb at any current intensity, up to 80 µA, were defined as unresponsive. The cortical representation of the hindpaw was reconstructed by drawing boundaries to enclose the sites eliciting hindlimb movement or movement of a given joint. We considered that the area reconstruction was complete when it was surrounded by unresponsive sites (or sites responding to another body part) and all the sites on the area were evaluated. Each responsive site is considered to represent 0.0625 mm² of cortical representation.

Statistical analysis was performed by two-way ANOVA with *Unloading* (Ground vs. Unloaded) and *Treatment* (Sham vs. IGF-1) as between factor. For relative area and threshold, we used a two-way ANOVA with *Joint* as within effect and *Unloading* and *Treatment* as between effect.

Ladder test

This experiment was performed on another group of 29 rats (7 C; 7 HU; 7 IGF-1; 8 HU-IGF-1). This procedure, adapted from Metz and Whishaw (2002), has been described elsewhere (Canu *et al.*, 2007). The apparatus consisted of a corridor (length = 98 cm; width = 12 cm) made of Plexiglas walls with a floor made of metal rungs (diameter = 4 mm) regularly spaced by 2 cm. The ladder was elevated 80 cm above the ground. The rats were trained one week before the first test. The rat was placed on the ladder at one extremity, and the home cage was positioned under cover to create a familiar environment at the other end. The rats were tested three times. The time spent to cross the ladder was recorded. The crossing time was often longer for the first or the third trial because rats explored the corridor. Thus, only the two best time performances were taken into account. Foot errors were detected off-line on video recordings for both forelimbs and hindlimbs. They correspond to steps in which the paw did not touch the rung or touched it and slipped between the rungs. Statistical analysis was performed by two-way ANOVA (*Unloading* × *Treatment*) and Tukey post-hoc test.

Spontaneous locomotor activity analysis

After the ladder test was completed, the rats were placed in an actimeter (Imetronic, Pessac, France) to measure spontaneous motor activity. The device is equipped with infrared beams allowing monitoring of horizontal (measure of ambulatory behavior) and vertical (rearing) motor activity. Each rat was placed in a Plexiglas cage (41 × 26 × 20 cm) for 13 hours (1 h with light on, 12 h with light off). We have distinguished two measures of motor activity. The first phase took place at 6 PM, i.e. when light was on. It gave clues about rat locomotor response to novelty. This phase was limited to 30 min to avoid any habituation of the rat. Longer sessions are a measure of general/trait activity (Mathews *et al.*, 2010). The second phase took place from 7 PM to 7 AM, during the lights-off period. This basal locomotor activity assessed during the dark period, after habituation to the environment, reflects motor abilities. Results are expressed as photocell counts over the 30-minute or 12-hour periods. Statistical analysis was performed by two-way ANOVA (*Unloading* × *Treatment*) and Tukey post-hoc test.

Statistical analyses

Results are presented as mean ± SEM. Normality was evaluated by Wilk's test. A P-value of less than 0.05 was chosen as the significance level for all statistical analyses.

Results

Electrophysiological mapping of motor cortex

Cortical area. We first determined the cortical area whose stimulation elicited hindlimb movements (Fig. 1A and B). In C rats, the area was 2.8 mm². Unloading strongly decreased the hindlimb motor representation [$F_{(1,35)}=31.3$, $p<0.001$]. This effect was observed in sham rats (C vs. HU: -50%, $p<0.001$). It was also present in animals treated with IGF-1, although less pronounced (IGF1 vs. HU-IGF1: -35%, $p<0.05$). IGF-1 infusion had a moderate effect on the map extent [$F_{(1,35)}=3.8$, $p=0.058$]. The increase was 10% in IGF-1 rats with respect to C ones.

Figure 1C presents the relative surface, i.e. the representative area of each joint. The sum of these areas exceeds the total surface presented above, because some points elicited a motor response in several joint simultaneously. The relative representation of joints varied [$F_{(2,32)}=23.1$, $p<0.001$], with a proximo-distal gradient in ground rats (C and IGF-1 groups): the more proximal the joint, the larger its cortical area. For instance, the cortical area for the hip was 1.8 times larger than toes area in C and IGF-1 rats. HU profoundly changed the hindlimb representation on the motor cortex [$F_{(4,32)}=25.5$, $p<0.001$]. The gradient disappeared (hip / toes ratio = 1) in HU rats [*Joint x Unloading* interaction: $F_{(4,32)}=8.3$, $p<0.001$]. In addition, the area devoted to ankle, knee and hip was smaller than in C rats (-55%, $p<0.05$; -63%, $p<0.001$; -58%, $p<0.001$ respectively). IGF-1 infusion slightly increased the relative area for all joints [$F_{(4,32)}=14.1$, $p<0.001$]. The increase varied from +34% (hip) to +41% (ankle) in IGF-1 group with respect to C rats. In addition, in the HU-IGF-1 group, IGF-1 infusion preserved the relative distribution of the different joints, with a hip / toes ratio of 1.6, i.e. very close to that observed in C rats.

Relative Threshold. For each stimulation site, the relative threshold, i.e. the current intensity necessary to induce a movement of a specific hindlimb joint (hip, knee, ankle or toes), was determined. The threshold varies according to the joint: distal joints were more easily activated than proximal ones [*joint* effect: $F_{(3,63)}=22.6$, $p<0.001$]. For instance, for the C group, the current intensity to activate the toes was $47.7 \pm 5.1 \mu\text{A}$, whereas value was $55.5 \pm 4.7 \mu\text{A}$ for the hip ($p<0.01$). This gradient disappeared in the IGF-1 group [*Joint x Treatment* interaction: $F_{(3,63)}=14.46$, $p<0.001$], where values were respectively 49.5 ± 3.3 (toes) and 47.3 ± 5.3 (hip). At contrast, the gradient was exacerbated in HU rats [*Joint x Unloading* interaction: $F_{(3,63)}=6.64$, $p<0.001$]. In this group, threshold for the toes was very

close to that of C group (47.3 ± 2.0), but hip threshold was increased (64.7 ± 9.5 , $p < 0.001$). There was no *Unloading* x *Treatment* interaction [$F_{(3,63)} = 0.06$, $p = 0.8$]. In fact, we observed an intermediate pattern in the HU-IGF-1 group, i.e. a high gradient from toes (52.8 ± 4.8) to knee (61.9 ± 4.1 , $p < 0.001$ with respect to the toes), and a lower value for the hip (55.0 ± 3.0).

These changes in relative threshold might explain the differences in map organization presented in Figure 1A. In C rats, toes threshold was lower; thus, we had more chance to observe a movement of this joint. In IGF-1 group, because of the loss of gradient, proximal joints such as knee and hip were more likely represented at absolute threshold, whereas at the opposite, increased threshold in HU group strongly decreased their cortical representation.

Motor activity in a novel environment and during the dark phase

Reactivity to novelty. We first analyzed the response of the rat to a novel environment (Fig. 2A). Unloaded rats were less active than ground ones [*Unloading* effect: $F_{(1,52)} = 17.4$, $p < 0.001$]. Tukey's post-hoc test showed a significant decrease in the HU group with respect to the C one (-60%; $p < 0.01$). At contrast, IGF-1 administration increased the motor activity [*Treatment* effect $F_{(1,52)} = 7.1$, $p < 0.01$]. The increase was moderate in ground rats (IGF-1 vs. C: +37%, n.s.), and more pronounced in unloaded animals (HU-IGF-1 vs. HU: +98%, $p = 0.06$). Thus, IGF-1 infusion partially prevented the effect of unloading.

Dark phase (Fig. 2B). For the 12h of dark period analysis, HU groups were less active than ground ones [*Unloading* effect: $F_{(1,52)} = 20.1$, $p < 0.001$]. Sham rats reduced their activity by 38% (HU vs. C: $p < 0.01$) whereas the reduction was -30% in IGF-1 rats (HU-IGF-1 vs. IGF-1: $p < 0.05$). At contrast, IGF-1 treatment increased motor activity [*Treatment* effect: $F_{(1,52)} = 9.8$), $p < 0.01$]. The increase was +27% in ground rats and +43% in unloaded ones.

Taken together, these results demonstrate that HU decreased motor activity whereas IGF-1 increased it, and thus IGF-1 prevented, at least partially, the effects of HU.

Ladder test

Time to cross the ladder. In C and IGF-1 rats, the time to cross the ladder was near 6 s (Fig. 3A), which corresponds to a walking speed of 12 cm/s. Unloading tended to increase this time [$F_{(1,54)} = 3.23$, $p = 0.08$]. Although the increase was 82% in HU rats with respect to C rats,

and 30% in HU-IGF-1 ones with respect to IGF-1 rats, these differences were not significant due to the high variability between animals.

Stride length. For C rats, the stride length corresponded to 5-6 rungs (5.4 ± 0.1), i.e. to 10-12 cm (Fig. 3C). This observation was very consistent from one rat to another. IGF-1 did not affect this parameter (5.3 ± 0.2 ; -2%, n.s.). At contrast, stride length was lower in HU rats [*Unloading* effect: $F_{(1,54)}=12.9$, $p<0.001$]. Indeed, the stride length corresponded to 4-5 rungs in these groups (HU: 4.6 ± 0.4 ; -17% with respect to C group, $p<0.001$; HU-IGF-1: 4.7 ± 0.3 ; -12% with respect to IGF-1 group, $p<0.05$).

Coordination between limbs. Ground rats produced a typical diagonal pattern for 90% of trials, which corresponds to alternating phases of support on two diagonal limbs and on three limbs. For example, the right hindlimb was in the swing phase; the left forelimb was then lifted from the surface and the body weight was then supported by diagonally opposite limbs (left hindlimb and right forelimb). In HU group, the coordination changed to a lateral walk for half trials. The limbs were then lifted off successively, in the following order: right hindlimb, right forelimb, left hindlimb, left forelimb. In the HU-IGF-1 group, the proportion of ladder crossing with a lateral pattern was only 25%. The difference between groups is significant (Fischer's exact test: $p<0.01$).

Horizontal distance. The horizontal distance between the place occupied by hindlimb and by homolateral forelimb has been measured (Fig. 3B). When ground rats walked on the ladder, the hindfoot reached the rung occupied by the ipsilateral forelimb. Thus, the distance was near 0. The same pattern was observed for IGF-1 group. At contrast, for groups submitted to unloading (HU and HU-IGF-1), the distance was negative, which means that the hindlimb reached a rung behind that previously contacted by the forelimb [*Unloading* effect [$F_{(1,54)} = 55.3$, $p< 0.001$].

Foot faults. C rats made only a few foot errors (0-1 per crossing) (Fig. 3D). At contrast, unloaded rats completely missed the rung or fell because of a misplacement of the paw more frequently than ground ones [*Unloading* effect: $F_{(1,54)}=32.9$, $p<0.001$]. HU rats made 0-3 misplacements per crossing (HU vs. C: $p<0.05$), and HU-IGF-1 ones made 0-4 faults (and even 8 for one rat, HU-IGF-1 vs. IGF-1: $p<0.001$). IGF-1 had no effect on foot errors. However, we observed a *Unloading* x *Treatment* interaction [$F_{(1,54)}=4.2$, $p<0.05$]. IGF-1 treatment exacerbated the effect of unloading.

In conclusion, IGF-1 in ground condition had no effect on rat performance on the ladder test, and this substance did not prevent deleterious effects of HU.

Discussion

The present work was designed to investigate the effect of HU on motor cortex and motor performance, and to determine whether IGF-1 administration during the whole unloading period could prevent deleterious effects of sensorimotor restriction. As previously described, HU induces a profound reorganization of the motor cortex and a global decrease in excitability. Our results showed that IGF-1 partially prevents these changes. In addition, with regard to motor activity, HU is characterized by a degradation of spontaneous activity, which is prevented by IGF-1 administration. In contrast, IGF-1 has no beneficial effect on motor performance in a skilled motor task. Taken together, this study shows the implication of IGF-1 in cortical plastic mechanisms and improves our knowledge on the link between motor cortex and physical abilities.

Cortical maps

In HU rats, we observed a decrease in the extent of cortical representation of hindlimb on the motor map. Such a decrease has already been reported in models of disuse. Indeed, HU (Langlet *et al.*, 2012) or immobilization (Viario *et al.*, 2014) drastically reduce the cortical map. In human also, immobilization affects the motor cortical area of the affected limb (Liepert *et al.*, 1995). Despite the importance of motor cortex integrity in movement control, there remains a paucity of evidence on the molecular mechanisms that sustain cortical reorganization. In control rats, a modulation of dopamine receptors changes the size of forelimb representation (Hosp *et al.*, 2009). With regards to HU rats, the reduction in the size of hindlimb representation might be caused by a decrease in dopamine level. As a matter of fact, the dopamine level is decreased after a HU period in the sensorimotor cortex (Canu *et al.*, unpublished data), and a depression in dopamine binding is observed in the striatum of rats exposed to microgravity (Miller *et al.*, 1989). The fact that IGF-1 does not seem to modulate dopamine level [although some neuroprotective effects were found in pathologies (Ebert *et al.*, 2008)] is consistent with our data showing that chronic administration of IGF-1 in C rats had no significant effect on the motor hindlimb area.

A role of GABA could not be excluded, since a change in the balance between excitation and inhibition has frequently been suggested to explain changes in cortical somatotopy (Jones, 1993). As a matter of fact, a decrease in GABA level (Canu *et al.*, 2006) and immunoreactivity (D'Amelio *et al.*, 1996) has been shown in HU rats, which could lead to the reduction in the size of hindlimb representation in HU rats. To sustain this hypothesis, Viario

and collaborators (2014) have shown that the shrinkage of motor map after forelimb immobilization is partially prevented by an acute GABA antagonist bicuculline application, suggesting that GABA mechanisms are involved in cortical reorganization. Whether the preventive action of IGF-1 on cortical reorganization in HU rats is due to its interaction with GABA is unclear. Chronic IGF-1 administration in cortex decreases GABA level (Maya-Vetencourt *et al.*, 2012). Thus, it should affect somatotopy in 'ground' rats. However, our study did not find a significant difference between C and IGF-1 rats. On the other hand, our results are in line with those of Viaro *et al.* (2014), since IGF-1, possibly through a decrease in GABA level, prevents the shrinkage of motor map in HU rats. This discrepancy between the effect of IGF-1 in ground rats and in unloaded ones could be attributed to the idea that the decrease in GABA level in the IGF-1 group is too weak to affect motor map, whereas the combination of HU and IGF-1 more strongly decreases GABA level, and in consequence the topographic movement reorganization is prevented.

In C rats, a proximo-distal gradient in activation threshold and map was shown, *i.e.* the distal joints were more easily activated than the proximal ones, but had a lower representation area. In the other groups, the gradient was lost for the relative area in HU rats, or for the threshold in IGF-1 animals. This observation suggests that area and threshold are sustained by different mechanisms.

Activation thresholds

The overall threshold was increased in the HU group, indicating that cortical area was less excitable. This observation is in accordance with the change in intrinsic properties of pyramidal neurons, towards a lower excitability (Canu *et al.*, 2010). The fact that chronic administration of IGF-1 does not modify excitability in ground rats is surprising. Indeed, IGF-1 has been shown to increase cortical excitability of the layer 4 neurons within the sensorimotor cortex (Mysoet *et al.*, 2015). Acute administration of IGF-1 is also known to modify the electrophysiological properties of brain stem or hippocampal neurons (Nuñez *et al.*, 2003; Xing *et al.*, 2007). It enhances Ca^{2+} currents through high voltage activated channels in pyramidal neurons of motor cortex in the rat and, then, increases neurotransmitter release and firing behavior of pyramidal neurons (Shan *et al.*, 2003). In addition, the action of IGF-1 on the GABAergic system (Maya-Vetencourt *et al.*, 2012) shifts the inhibition / excitation balance towards a higher excitation. At contrast, when administered in unloaded rats, IGF-1 partially prevents cortical hypoactivity: it restored excitatory thresholds close to that found in C group. One possibility to explain the difference in IGF-1 action in ground and unloaded rats is that neuronal excitability is already at a high level in

ground rats, and thus it does not allow to show a significant decrease in threshold, whereas in unloaded rats, an increase can be highlighted since unloading depresses excitability of pyramidal neurons.

Motor activity

This study confirms that HU has deleterious effects on motor activity. As already shown, unloaded rats have a very low activity level after reloading, in response to both a novel environment and dark period (Canu *et al.*, 2007). In contrast, a chronic infusion of IGF-1 increases the motor activity. Response to novelty is influenced by internal factors such as motor abilities, and is also strongly modulated by emotional factors (Gentsch *et al.*, 1982; Mogensen *et al.*, 2003), whereas locomotor activity assessed during the dark period strictly reflects motor abilities. Since both conditions (novelty and dark period) are similarly affected by HU as well as IGF-1, we assume that hypo- or hyperactivity is due to an effect of HU or IGF-1 on motor abilities and not to emotional factors. Decrease in locomotor activity can be explained by muscular and nervous factor (Clark *et al.*, 2006). Regarding the role of IGF-1, the present data demonstrate that this substance increases motor activity in ground rats, and partially prevents the hypoactivity in HU ones. A possible explanation for this might be that IGF-1 has beneficial effects on muscle. Indeed, it promotes muscle hypertrophy (Ye *et al.*, 2013). However, a direct effect of IGF-1 on muscle is very unlikely, because we injected locally a very low quantity of substance. In addition, muscle mass did not increase after IGF-1 cortical administration (unpublished results). Thus, effect of IGF-1 on locomotor activity seems to be due to central factors rather than to peripheral ones. Another possible explanation is that IGF-1 could increase the locomotor activity through a modulation of BDNF activity in the brain. IGF-1 is known to play a key role in the regulation of BDNF (Ding *et al.*, 2006; Torres-Alemán, 2010; Fernandez & Torres-Alemán, 2012), and a hyperactivity has been reported following *i.c.v* administration of BDNF (Naert *et al.*, 2006).

Motor performance

Motor performance, evaluated by the number of paw errors, is impaired in ladder walking in HU rats. In addition, the locomotor pattern (stride length, distance between homolateral limbs during stance) is affected. This is probably due to a lower engagement of hindlimb forward, although only a kinematic study can answer this question. These alterations might be due to the changes in motor cortex properties, since ladder walking is known to require precision and to involve supraspinal circuit (Metz & Whishaw, 2002). Contrary to expectations, our

study did not find a beneficial effect of cortical IGF-1 administration on performance in the skilled motor task. It is somewhat surprising since IGF-1 partially prevents deleterious effects of HU on motor cortex, and increases spontaneous motor activity. A possible explanation for this observation is that IGF-1 effect on motor cortex is too moderate and thus is insufficient to have a repercussion on the motor ability. Moreover, motor cortex is not the only nervous structure altered by HU. For instance, previous studies have found a decrease in soleus nerve velocity due to an alteration of myelin sheath (Canu *et al.*, 2009), or an alteration of structure (De-Doncker *et al.*, 2006) and electrophysiological properties (Cormery *et al.*, 2005) of motoneurons. Thus, alteration of motor performance is due to a combination of factors, at different levels of the neuromuscular system (central, peripheral, muscular). Taken together, although cortical administration of IGF-1 partially prevents cortical reorganization induced by HU, it is insufficient to prevent all functional changes.

Functional implications and conclusion

This study has shown that IGF-1 can alleviate the consequences of disuse on the primary motor cortex. In addition, it strengthens the idea that prevention of cortical map reorganization can have some benefic action on motor activity in HU rats. This finding has important practical implication for developing treatments to prevent severe deconditioning and to facilitate functional recovery in patients.

Numerous studies have shown a correlation between cortical map area and motor abilities. Even if a simple increase in spontaneous motor activity does not affect cortical map (Kleim *et al.*, 2002), a repeated use of a limb (Gindrat *et al.*, 2015) or a motor skill learning (Kleim *et al.*, 1998; Münte *et al.*, 2002; Molina-Luna *et al.*, 2008) increase the limb cortical area representation. Conversely, a decrease in motor activity, as found in immobilization in humans (Liepert *et al.*, 1995) and in HU in rats (Langlet *et al.*, 2012), induces a shrinkage of motor maps and a degradation of motor skills. However, even if a correlation appears, whether motor map directly influences motor skills still remains a subject of debate. A recent study performed in the auditory cortex supports the idea that cortical map expansion plays a major role in perceptual learning, but is not necessary to maintain perceptual improvements (Reed *et al.*, 2011). At the opposite, the functional role of map shrinkage in disuse situations is not clear. Further research needs to examine more closely the links between cortical motor map and behavior.

References

- Canu MH, Carnaud M, Picquet F & Goutebroze L (2009). Activity-dependent regulation of myelin maintenance in the adult rat. *Brain Res* 1252, 45–51.
- Canu MH, Darnaudéry M, Falempin M, Maccari S & Viltart O (2007). Effect of hindlimb unloading on motor activity in adult rats: impact of prenatal stress. *Behav Neurosci* 121, 177–185.
- Canu MH & Garnier C (2009). A 3D analysis of fore- and hindlimb motion during overground and ladder walking: Comparison of control and unloaded rats. *Exp Neurol* 218, 98–108.
- Canu MH, Garnier C, Lepoutre FX & Falempin M (2005). A 3D analysis of hindlimb motion during treadmill locomotion in rats after a 14-day episode of simulated microgravity. *Behav Brain Res* 157, 309–321.
- Canu MH, Picquet F, Bastide B & Falempin M (2010). Activity-dependent changes in the electrophysiological properties of regular spiking neurons in the sensorimotor cortex of the rat in vitro. *Behav Brain Res* 209, 289–294.
- Canu MH, Stevens L, Ricart-Firinga C, Picquet F & Falempin M (2001). Effect of the β 2-agonist clenbuterol on the locomotor activity of rat submitted to a 14-day period of hypodynamia-hypokinesia. *Behav Brain Res* 122, 103–112.
- Canu MH, Treffort N, Picquet F, Dubreucq G, Guerardel Y & Falempin M (2006). Concentration of amino acid neurotransmitters in the somatosensory cortex of the rat after surgical or functional deafferentation. *Exp Brain Res* 173, 623–628.
- Carro E, Nuñez A, Busiguina S & Torres-Aleman I (2000). Circulating insulin-like growth factor I mediates effects of exercise on the brain. *J Neurosci* 20, 2926–2933.
- Clark BC, Manini TM, Bolanowski SJ & Ploutz-Snyder LL (2006). Adaptations in human neuromuscular function following prolonged unweighting: II. Neurological properties and motor imagery efficacy. *J Appl Physiol* 101, 264–272.
- Cormery B, Beaumont E, Csukly K & Gardiner P (2005). Hindlimb unweighting for 2 weeks alters physiological properties of rat hindlimb motoneurons. *J Physiol* 568, 841–850.
- D'Amelio F, Fox RA, Wu LC & Dauntton NG (1996). Quantitative changes of GABA-immunoreactive cells in the hindlimb representation of the rat somatosensory cortex after 14-day hindlimb unloading by tail suspension. *J Neurosci Res* 44, 532–539.
- De-Doncker L, Kasri M & Falempin M (2006). Soleus motoneuron excitability after rat hindlimb unloading using histology and a new electrophysiological approach to record a neurographic analogue of the H-reflex. *Exp Neurol* 201, 368–374.
- Ding Q, Vaynman S, Akhavan M, Ying Z & Gomez-Pinilla F (2006). Insulin-like growth factor I interfaces with brain-derived neurotrophic factor-mediated synaptic plasticity to modulate aspects of exercise-induced cognitive function. *Neuroscience* 140, 823–833.
- Ebert AD, Beres AJ, Barber AE & Svendsen CN (2008). Human neural progenitor cells over-expressing IGF-1 protect dopamine neurons and restore function in a rat model of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 209, 213–223.

- Fernandez AM & Torres-Alemán I (2012). The many faces of insulin-like peptide signalling in the brain. *Nat Rev Neurosci* 13, 225–239.
- Fortney SM, Schneider VS & Greenleaf JE (1996). The physiology of bed rest.
- Gentsch C, Lichtsteiner M, Kraeuchi K & Feer H (1982). Different reaction patterns in individually and socially reared rats during exposures to novel environments. *Behav Brain Res* 4, 45–54.
- Georgopoulos AP & Carpenter AF (2015). Coding of movements in the motor cortex. *Curr Opin Neurobiol* 33C, 34–39.
- Gindrat A, Chytiris M, Balerna M, Rouiller EM & Ghosh A (2015). Report Use-Dependent Cortical Processing from Fingertips in Touchscreen Phone Users. *Curr Biol* 25, 109–116.
- Jones EG (1993). GABAergic neurons and their role in cortical plasticity in primates. *Cereb Cortex* 3, 361–372.
- Kleim JA, Barbay S & Nudo RJ (1998). Functional reorganization of the rat motor cortex following motor skill learning. *J Neurophysiol* 80, 3321–3325.
- Kleim JA, Cooper NR & VandenBerg PM (2002). Exercise induces angiogenesis but does not alter movement representations within rat motor cortex. *Brain Res* 934, 1–6.
- Langlet C, Bastide B & Canu MH (2012). Hindlimb unloading affects cortical motor maps and decreases corticospinal excitability. *Exp Neurol* 237, 211–217.
- Liepert J, Tegenthoff M & Malin JP (1995). Changes of cortical motor area size during immobilization. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 97, 382–386.
- Llorens-Martín M, Torres-Alemán I & Trejo JL (2010). Exercise modulates insulin-like growth factor 1-dependent and -independent effects on adult hippocampal neurogenesis and behaviour. *Mol Cell Neurosci* 44, 109–117.
- Mathews IZ, Morrissey MD & McCormick CM (2010). Individual differences in activity predict locomotor activity and conditioned place preference to amphetamine in both adolescent and adult rats. *Pharmacol Biochem Behav* 95, 63–71.
- Maya-Vetencourt JF, Baroncelli L, Viegi A, Tiraboschi E, Castren E, Cattaneo A & Maffei L (2012). IGF-1 Restores Visual Cortex Plasticity in Adult Life by Reducing Local GABA Levels. *Neural Plast* 2012, 1–10.
- Metz GA & Whishaw IQ (2002). Cortical and subcortical lesions impair skilled walking in the ladder rung walking test: A new task to evaluate fore- and hindlimb stepping, placing, and co-ordination. *J Neurosci Methods* 115, 169–179.
- Miller JD, McMillen BA, McConnaughey MM, Williams HL & Fuller CA (1989). Effects of microgravity on brain neurotransmitter receptors. *Eur J Pharmacol* 161, 165–171.
- Mogensen J, Wörtwein G, Plenge P & Møllerup ET (2003). Serotonin, locomotion, exploration, and place recall in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 75, 381–395.

- Molina-Luna K, Hertler B, Buitrago MM & Luft AR (2008). Motor learning transiently changes cortical somatotopy. *Neuroimage* 40, 1748–1754.
- Morey-Holton ER & Globus RK (2002). Hindlimb unloading rodent model: technical aspects. *J Appl Physiol* 92, 1367–1377.
- Münste TF, Altenmüller E & Jäncke L (2002). The musician's brain as a model of neuroplasticity. *Nat Rev Neurosci* 3, 473–478.
- Mysoet J, Canu M-H, Cieniewski-Bernard C, Bastide B & Dupont E (2014). Hypoactivity Affects IGF-1 Level and PI3K/AKT Signaling Pathway in Cerebral Structures Implied in Motor Control. *PLoS One* 9, e107631.
- Mysoet J, Dupont E, Bastide B & Canu M-H (2015). role of IGF-1 in cortical plasticity and functional deficit induced by sensorimotor restriction. *Behav Brain Res* 290, 1–7.
- Naert G, Ixart G, Tapia-Arancibia L & Givalois L (2006). Continuous i.c.v. infusion of brain-derived neurotrophic factor modifies hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity, locomotor activity and body temperature rhythms in adult male rats. *Neuroscience* 139, 779–789.
- Nishijima T, Piriz J, Duflot S, Fernandez AM, Gaitan G, Gomez-Pinedo U, Verdugo JMG, Leroy F, Soya H, Nuñez A & Torres-Aleman I (2010). Neuronal Activity Drives Localized Blood-Brain-Barrier Transport of Serum Insulin-like Growth Factor-I into the CNS. *Neuron* 67, 834–846.
- Nuñez A, Carro E & Torres-Aleman I (2003). Insulin-like growth factor I modifies electrophysiological properties of rat brain stem neurons. *J Neurophysiol* 89, 3008–3017.
- Reed A, Riley J, Carraway R, Carrasco A, Perez C, Jakkamsetti V & Kilgard MP (2011). Cortical Map Plasticity Improves Learning but Is Not Necessary for Improved Performance. *Neuron* 70, 121–131.
- Roberts DR, Ramsey D, Johnson K, Kola J, Ricci R, Hicks C, Borckardt JJ, Bloomberg JJ, Epstein C & George MS (2010). Cerebral cortex plasticity after 90 days of bed rest: Data from TMS and fMRI. *Aviat Sp Environ Med* 81, 30–40.
- Shan H, Messi ML, Zheng Z, Wang Z-M & Delbono O (2003). Preservation of motor neuron Ca²⁺ channel sensitivity to insulin-like growth factor-1 in brain motor cortex from senescent rat. *J Physiol* 553, 49–63.
- Thomason DB & Booth FW (1990). Atrophy of the soleus muscle by hindlimb unweighting. *J Appl Physiol* 68, 1–12.
- Torres-Aleman I (2010). Toward a comprehensive neurobiology of IGF-I. *Dev Neurobiol* 70, 384–396.
- Viaro R, Budri M, Parmiani P & Franchi G (2014). Adaptive changes in the motor cortex during and after longterm forelimb immobilization in adult rats. *J Physiol* 592, 2137–2152.

Viguiier M, Dupui P & Montoya R (2009). Posture analysis on young women before and after 60 days of -6?? head down bed rest (Wise 2005). *Gait Posture* 29, 188–193.

Xing C, Yin Y, Chang R, Gong X, He X & Xie Z (2007). Effects of insulin-like growth factor 1 on synaptic excitability in cultured rat hippocampal neurons. *Exp Neurol* 205, 222–229.

Ye F, Mathur S, Liu M, Borst SE, Walter GA, Sweeney HL & Vandenborne K (2013). Overexpression of insulin-like growth factor-1 attenuates skeletal muscle damage and accelerates muscle regeneration and functional recovery after disuse. *Exp Physiol* 98, 1038–1052.

Competing interests.

The authors declare that they have no competing interests.

Author contributions.

Conception and design of the experiments: JM, ED, MHC

Collection, assembly, analysis and interpretation of data: JM, ED, MHC

Drafting the article or revising it critically for important intellectual content: JM, ED, MHC, BB

Funding. The present research work has been supported by the Centre National d'Etudes Spatiales (CNES).

FIGURE LEGENDS

Figure 1 : Effect of HU and/or IGF-1 on functional organization of the motor cortex. A. Typical maps presenting hindlimb cortical areas. Black dots indicate unresponsive electrode penetration in layer V of the M1 area. Squares correspond to the cortical sites where stimulation induced movement of the different joints of the hindlimb. Maps were constructed with absolute threshold currents. B. Cortical surface area eliciting a movement of one part of the hindlimb. C. Cortical surface area occupied by hindlimb movements. Relative areas were constructed with relative threshold currents. D. Relative threshold for the different joints of the hindlimb. Data are means \pm S.E.M. * and *** indicate a significant difference ($p < 0.05$ and $p < 0.001$ respectively).

Figure 2 : Effect of HU and/or IGF-1 on spontaneous activity. Spontaneous motor activity in response to a novel environment (A) and during the dark phase (B). Data are means \pm S.E.M. *, ** and *** indicate a significant difference ($p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$ respectively).

Figure 3: Effect of HU and/or IGF-1 on the ladder test. (A) Time to cross the ladder, (B) stride length for the right forelimb, (C) horizontal distance between homolateral hind- and forelimb during stance, and (D) number of paw errors. Data are means \pm S.E.M. *, ** and *** indicate a significant difference with respect to C group ($p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$ respectively), ### indicate a significant difference ($p < 0.001$) with respect to IGF-1 group.

FIGURE 1

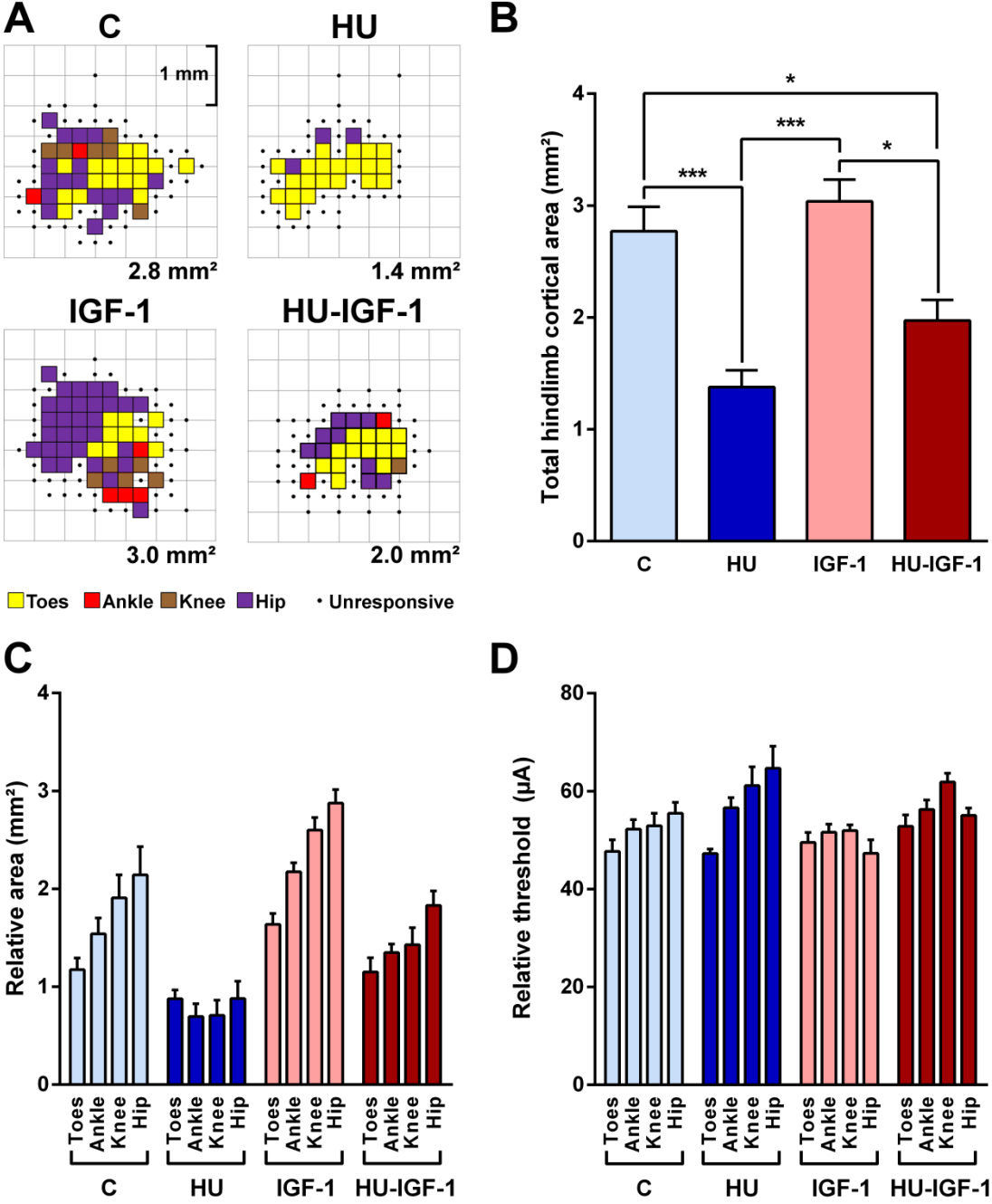


FIGURE 2

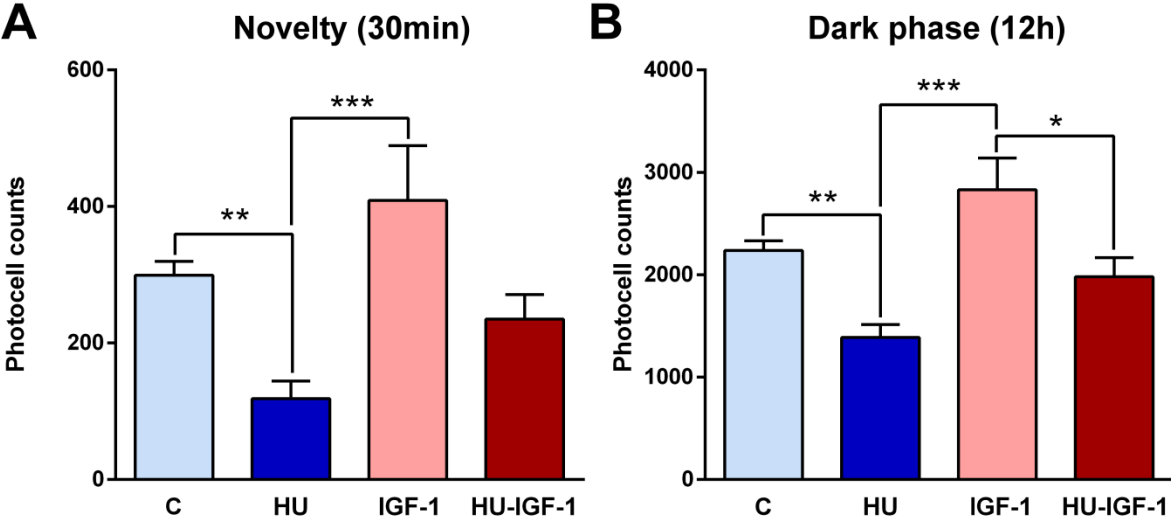


FIGURE 3

