



**HAL**  
open science

# Etude de l'impact du vieillissement sur les effets métaboliques et musculaires de la Neureguline 1

Kevin Caillaud

► **To cite this version:**

Kevin Caillaud. Etude de l'impact du vieillissement sur les effets métaboliques et musculaires de la Neureguline 1. Education. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2015. Français. NNT : 2015CLF20065 . tel-02061620

**HAL Id: tel-02061620**

**<https://theses.hal.science/tel-02061620>**

Submitted on 8 Mar 2019

**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.



ECOLE DOCTORALE

Des Sciences de la Vie, Santé, Agronomie, Environnement

## Thèse

Pour obtenir le grade de

## DOCTEUR

Discipline : Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives.

*Spécialité : Physiologie cellulaire de l'exercice*

*Soutenue le 15 décembre 2015*

Présenté par :

**Kevin CAILLAUD**

# ETUDE DE L'IMPACT DU VIEILLISSEMENT SUR LES EFFETS METABOLIQUES ET MUSCULAIRES DE LA NEUREGULINE 1

### Rapporteurs :

Pr Marc FRANCAUX (PU) Faculté des sciences de la motricité, Université Catholique du Louvain

Dr Guillaume PY (MCF-HDR) UFR STAPS, Université Montpellier 1

### Membres :

Pr Nathalie BOISSEAU (PU) UFR STAPS, Université Clermont-F<sup>d</sup> II (Directrice de thèse)

Dr Alain LACAMPAGNE (DR) PHYSMEDEXP, INSERM, U1046, Montpellier (Directeur de thèse)

Dr Pascal SIRVENT (MCF) UFR STAPS, Université Clermont-F<sup>d</sup> II (co-encadrant)

Dr Dominique DARDEVET (DR) UNH, INRA, UMR1019, Clermont-F<sup>d</sup>

Laboratoire (AME2P) des Adaptations Métaboliques à l'Exercice en Conditions  
Physiologiques et Pathologiques, Clermont-Ferrand

---

# REMERCIEMENTS

A l'heure de clôturer ce travail de plus de 4 années, je voudrais remercier toutes les personnes m'ayant aidé, soutenu ou même « subi » pendant cette période si particulière de ma vie.

*Au Professeur Nathalie Boisseau et au Docteur Pascal Sirvent,*

Je tiens à vous remercier de m'avoir accordé votre confiance et d'avoir accepté de m'encadrer tout au long de ce travail. Je me souviendrais toujours du moment, dans le jardin de mes parents, ou j'ai reçu votre appel. Je vous suis reconnaissant de m'avoir fait bénéficier de votre expérience et de vos connaissances. J'ai beaucoup appris à vos cotés sur la recherche et sur moi-même.

*Au Docteur Alain Lacampagne,*

Je tiens à vous remercier de m'avoir encadré durant ce travail. L'évolution de ce travail de recherche m'a éloigné du laboratoire de Montpellier mais j'ai beaucoup appris durant mon séjour au sein de votre équipe.

*Au Professeur Marc Francaux et au Docteur Guillaume Py,*

Vous avez accepté d'être les rapporteurs de ce travail, j'en suis très honoré. Je vous remercie et espère qu'il vous apportera satisfaction.

*Au Docteur Dominique Dardevet,*

Vous avez accepté de faire partie de mon comité de thèse puis de mon jury de thèse, je suis très honoré de votre présence et vous en remercie. Egalement, je voudrais vous remercier pour nos échanges sur la balance protéique et sa régulation nutritionnelle. Je voudrais enfin vous remercier pour votre disponibilité durant mes expérimentations à Theix.

*Aux membres de l'AME2P,*

Je vous remercie pour votre présence tout au long de ce travail et pour tous les moments d'échanges professionnels et amicaux. Petite dédicace pour Monique, LA Monique, merci pour ton énergie, ta bonne humeur, tes compétences et SURTOUT ton franc parlé ☺

*Aux stagiaires,*

Merci pour votre investissement et votre travail. Vous avez été essentiels à ce projet.

*Aux collègues doctorants et à Titi,*

Quinquin, Vivinou, Kluka, Seba et Titi (oui tu es MCF mais bon t'est jeune ☺). D'une manière ou d'une autre vous avez tous été des personnes extrêmement précieuses pour moi tout au long de ces quatre années. Nos moments de franche rigolade au labo, les westerns horribles les uns après les autres, les bières pour quand ca marchait enfin. Les sorties, les bouffes ... la vie quoi ... c'est vous qui avez fait de cette expérience une tranche de vie formidable.

*A Erwann et Maxou,*

Mes amis une seule chose à vous dire ... un très très grand merci. Vous avez été tous les deux des piliers pour moi dans les moments les plus durs. Vous êtes des hommes vrais et vous débordez de projets. Ne changez RIEN !!

*A Tonio,*

Merci pour ton soutien ... après bientôt 26 ans d'amitié tes encouragements, surtout dans cette fin de thèse m'ont beaucoup touché. Accroche-toi dans tes projets mon pote !

*A mon axelou,*

Mon frerot, tu ne m'a pas vu beaucoup durant cette thèse mais maintenant c'est terminé. Merci à toi d'être la, je vais profiter de toi maintenant.

*A ma mère,*

Je t'aime maman. Tout est dit !

*A mon père,*

Cette thèse nous a rapproché toi et moi. Tes mots d'encouragements m'ont aidé en cette fin de thèse. Merci Papa.

*A TOI,*

Ophélie, les mots me manquent pour t'exprimer ma gratitude, mon amour et ma joie de vivre à tes cotés. La vie est devant nous ... vive la vie avec toi et peut être pas que toi ;-)

# SOMMAIRE

<b>LISTES DES FIGURES</b>	<b>I</b>
<b>LISTE DES ACRONYMES</b>	<b>IV</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE</b>	<b>6</b>
<b>1 LA VOIE NRG1/ERBBS</b>	<b>7</b>
1.1 La neureguline 1 (NRG1)	9
1.1.1 Bref historique	9
1.1.2 Un seul gène mais de multiples produits	10
1.2 Les récepteurs ErbBs	16
1.2.1 Structure	17
1.2.2 Mode d'action	17
1.2.3 Divers signaux intracellulaires potentiels	23
1.3 Fonctions physiologiques de la voie NRG1/ErbB	25
1.3.1 Un rôle primordial dans la morphogénèse cardiaque	25
1.3.2 Rôle dans le système nerveux central et périphérique	28
1.4 Implications physiopathologiques de la voie NRG1/ErbB	31
1.4.1 NRG1/ErbB et pathologies du système nerveux central	31
1.4.2 NRG1/ErbB et Cancers	34
1.4.3 Autres implications pathologiques	36
<b>2 Voie NRG1/ErbB et vieillissement</b>	<b>37</b>
2.1 NRG1, vieillissement et métabolisme glucidique	38
2.1.1 Vieillessement et métabolisme glucidique	39
2.1.2 NRG1 et métabolisme glucidique	47
2.1.3 Synthèse et perspectives	56
2.2 NRG1, vieillissement et fonction musculaire	58
2.2.1 La sarcopénie	59
2.2.2 Rôle de la NRG1 dans la myogénèse et la régénération du muscle squelettique.	70
2.2.3 Synthèse et perspectives	75
2.3 NRG1, VIEILLESSEMENT ET FONCTION CARDIAQUE	77
2.3.1 Vieillessementde la fonction cardiaque	78
2.3.2 NRG1 et physiologie cardiaque	83
2.3.3 Synthèse et perspectives	88

<b>OBJECTIFS</b>	<b>90</b>
<b>MATERIEL ET METHODES</b>	<b>93</b>
<b>1 Animaux</b>	<b>94</b>
<b>2 Expérimentations <i>IN VIVO</i></b>	<b>95</b>
2.1 Exploration de la tolérance au glucose	95
2.1.1 OGTT	95
2.1.2 Mesures métaboliques	96
2.2 Electrostimulation	98
2.3 Estimation de la composition corporelle	99
<b>3 Injections de NRG1 et euthanasie</b>	<b>100</b>
3.1 La Neureguline-1	100
3.2 Injection de NRG1	100
3.3 Euthanasie	100
<b>4 Analyses biochimiques</b>	<b>101</b>
4.1 Extraction des protéines	101
4.2 Dosage des protéines	101
4.3 Western blot	101
4.3.1 Electrophorèse SDS-PAGE	101
4.3.2 Transfert	101
4.3.3 Immunodetection	102
4.3.4 Numérisation et normalisation des resultats	103
<b>5 Statistiques</b>	<b>104</b>

**ETUDE 1 : LA NEUREGULINE DE TYPE 1 AMELIORE LA TOLERANCE AU GLUCOSE  
CHEZ DES RATS ADULTES ET AGES. 105**

<b>1</b>	<b>INTRODUCTION</b>	<b>106</b>
<b>2</b>	<b>METHODOLOGIE</b>	<b>108</b>
2.1	Protocole expérimental	108
2.2	Modèles expérimentaux et mesures réalisées	109
<b>3</b>	<b>RÉSULTATS</b>	<b>110</b>
3.1	Composition corporelle et caractéristiques métaboliques	110
3.2	Résultats du OGTT	111
3.2.1	Réponses glycémiques:	111
3.2.2	Réponses insuliniques :	113
3.3	Les analyses biochimiques	116
3.3.1	Expression basale des ErbBs	117
3.3.2	voies de signalisation musculaire	118
3.3.3	voies de signalisation hépatique	120
<b>4</b>	<b>DISCUSSION</b>	<b>123</b>

**ETUDE 2 : CONTRACTION MUSCULAIRE *IN VIVO* ET ACTIVATION DE LA VOIE  
NRG1/ERBB : EFFET DU VIEILLISSEMENT. 128**

<b>1</b>	<b>INTRODUCTION</b>	<b>129</b>
<b>2</b>	<b>MATERIEL ET METHODES</b>	<b>131</b>
2.1	Protocole expérimental	131
2.2	Modèles expérimentaux et mesures réalisées	132
<b>3</b>	<b>RÉSULTATS</b>	<b>132</b>
3.1	Expression et clivage de la NRG1 dans le muscle squelettique au repos	132
3.2	Expression et activation des ErbB3 et ErbB4 dans le muscle squelettique au repos	134
3.3	Effet de la contraction musculaire <i>IN VIVO</i> sur le clivage de la NRG1.	135
3.4	Effet de la contraction musculaire <i>IN VIVO</i> sur l'activation des ErbBs.	136
3.5	Effet du vieillissement sur l'expression musculaire d'ADAM17.	138
3.6	Effet du vieillissement sur l'expression musculaire de TIMP3	139
3.7	Effet du vieillissement sur l'expression musculaire des $\gamma$ -sécrétases.	140
<b>4</b>	<b>DISCUSSION</b>	<b>142</b>

<b>ETUDE 3 : EFFET DU VIEILLISSEMENT SUR LA SIGNALÉTIQUE CELLULAIRE DE LA NRG1 AU NIVEAU CARDIAQUE.</b>	<b>152</b>
<b>1 INTRODUCTION</b>	<b>153</b>
<b>2 METHODOLOGIE</b>	<b>155</b>
2.1 Protocole expérimental	155
2.2 Modèles expérimentaux et mesures réalisées	155
<b>3 RÉSULTATS</b>	<b>156</b>
3.1 Expression basale des récepteurs ErbBs dans le cœur	156
3.2 Expression et activation des protéines régulatrices de la fonction des ErbBs	157
3.3 Activation des récepteurs ErbBs par la NRG1	158
3.4 Activation des voies de signalisation en aval des ErbBs	160
<b>4 DISCUSSION</b>	<b>161</b>
<b>DISCUSSION GENERALE</b>	<b>165</b>
<b>PERSPECTIVES</b>	<b>174</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>177</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>206</b>
Publications en rapport direct avec le travail doctoral	207
Publications en rapport avec la neuregulin	207
Publications annexe au travail au sein du laboratoire	207

---

# LISTES DES FIGURES

FIGURE 1: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA VOIE NRG/ErBB .....	7
FIGURE 2: EVOLUTION CHRONOLOGIQUE DES PUBLICATIONS INDEXEES <i>PUBMED</i> POUR "NEUREGULIN 1" .....	10
FIGURE 3: SCHEMA DU GENE <i>NRG1</i> ET DE LA STRUCTURE DES ISOFORMES DE NEUREGULINE1 ( <i>NRG1</i> ). .....	12
FIGURE 4: COMPARAISON DES MODES D' ACTIONS DES <i>NRG1</i> DE TYPE 1 ET 3 .....	14
FIGURE 5: FAMILLE DES RECEPTEURS ERBBs ET LEURS LIGANDS. ....	16
FIGURE 6: MODE D' ACTION DES ERBBs. ....	18
FIGURE 7: SCHEMA PROTOTYPIQUE DE LA SIGNALISATION NUCLEAIRE D'ERBB4.....	21
FIGURE 8: EVOLUTION D'UN RESEAU CELLULAIRE ETENDU. ....	22
FIGURE 9: SCHEMA DE L' INFLUENCE DE L' ACTIVITE DE LA VOIE <i>NRG1/ErBB</i> SUR LES FONCTIONS COGNITIVES.....	31
FIGURE 10: EXEMPLE DE DIFFERENTS TRAITEMENTS CIBLANT LA SIGNALISATION DES ERBBs .....	34
FIGURE 11: SIGNALISATION MUSCULAIRE DE L' INSULINE ET IMPACT DU VIEILLISSEMENT.....	41
FIGURE 12: SIGNALISATION HEPATIQUE DE L' INSULINE ET IMPACT DU VIEILLISSEMENT .....	42
FIGURE 13: EFFET DE L' AGE SUR LES MITOCHONDRIES ET LES LIPIDES INTRAMUSCULAIRES CHEZ L' HUMAIN.....	44
FIGURE 14: CAPTATION DE GLUCOSE INDUITE PAR L' INSULINE (I), LA <i>NRG1</i> (H) OU LES DEUX DANS DES CELLULES L6E9 DE RATS.....	47
FIGURE 15: LA <i>NRG1</i> (H), L' INSULINE (I) OU LES DEUX ACTIVENT PI3K, AKT (PKB) ET PKC DANS DES CELLULES MUSCULAIRES L6E9 DE RATS. ....	49
FIGURE 16: EFFET D' UN TRAITEMENT CHRONIQUE (48H) AVEC DE LA <i>NRG1</i> (HRG) SUR L' OXIDATION DES SUBSTRATS DANS DES CELLULES MUSCULAIRES L6E9 DE RAT. ....	50
FIGURE 17: INTERACTIONS ENTRE LA VOIE <i>NRG1/ErBB</i> ET CELLE DE L' INSULINE DANS LE MUSCLE SQUELETTIQUE. MISE EN PERSPECTIVE AVEC L' EFFET DU VIEILLISSEMENT SUR LA VOIE DE L' INSULINE ET SES ROLES SUR L' HOMEOSTASIE GLUCIDIQUE.....	51
FIGURE 18: INTERACTIONS ENTRE LA VOIE <i>NRG1/ErBB</i> ET CELLE DE L' INSULINE DANS LE FOIE. MISE EN PERSPECTIVE AVEC L' EFFET DU VIEILLISSEMENT SUR LA VOIE DE L' INSULINE ET SES ROLES SUR L' HOMEOSTASIE GLUCIDIQUE.....	53
FIGURE 19: IRM DES MUSCLES DU MEMBRE INFERIEUR D' HOMME ADULTE ET AGE .....	59
FIGURE 20: REPONSE PROTEOSYNTHETIQUE SUITE A LA REALISATION D' UN EXERCICE DE RENFORCEMENT MUSCULAIRE CHEZ DES SUJETS JEUNES ET AGES. ....	63
FIGURE 21: SCHEMA RECAPITULATIF DES ROLES DE LA <i>NRG1</i> SUR LE TISSU MUSCULAIRE ET MISE EN PERSPECTIVE AVEC LES ALTERATIONS LIEES AU VIEILLISSEMENT.....	74
FIGURE 22: ROLES DE LA VOIE <i>NRG1/ErBB</i> AU NIVEAU CARDIAQUE. MISE EN PERSPECTIVE AVEC L' EFFET DU VIEILLISSEMENT. ....	84
FIGURE 23: SCHEMA DE L' EVOLUTION DE LA SIGNALISATION <i>NRG1/ErBB</i> DURANT LE DEVELOPPEMENT D' UNE INSUFFISANCE CARDIAQUE.....	86
FIGURE 24: SCHEMA DU PROTOCOLE D' OGTT .....	95
FIGURE 25: GLUCOMETRE ACCUCHECK POUR LA MESURE DE GLYCEMIE.....	96
FIGURE 26: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L' INDICE HEPATIQUE DE RESISTANCE A L' INSULINE (HIRI). ....	97
FIGURE 27: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L' INDICE MISI. ....	97
FIGURE 28: DISPOSITIF D' ELECTROSTIMULATION .....	98
FIGURE 29: APPAREIL DE MESURE DE LA COMPOSITION CORPORELLE .....	99
FIGURE 30 : EFFETS D' UNE INJECTION AIGUË DE <i>NRG1</i> SUR LES NIVEAUX DE GLUCOSE DANS LE SANG PENDANT UN TEST DE TOLERANCE ORALE AU GLUCOSE CHEZ L' ADULTE ET CHEZ DES RATS AGES.....	111

FIGURE 31 : AUC NET GLUCOSE DURANT L'OGTT .....	112
FIGURE 32: EFFETS D'UNE INJECTION AIGUË DE NRG1 SUR LES NIVEAUX D'INSULINE PLASMATIQUE AU COURS DE L'OGTT CHEZ DES RATS ADULTES ET AGES. ....	113
FIGURE 33: AUC NETS DE L'INSULINE PLASMATIQUE PENDANT L'OGTT .....	114
FIGURE 34: EFFETS D'UNE INJECTION AIGUË DE NRG1 SUR LES INDICES HIRI ET MISI DURANT UN OGTT. ....	115
FIGURE 35: EXPRESSION BASALE DES ERBBs DANS LE GASTROCNEMIIEN ET LE FOIE DE RATS ADULTES. ....	117
FIGURE 36: EFFET D'UNE INJECTION AIGUË DE NRG1 SUR LES RATIOS DE PHOSPHORYLATION DES ERBBs DANS LE GASTROCNEMIIEN DE RATS ADULTES ET AGES. ....	118
FIGURE 37: EFFET D'UNE INJECTION AIGUË DE NRG1 SUR LES RATIOS DE PHOSPHORYLATION D'AKT, DE p42/p44 ET DE PKCZETA DANS LE GASTROCNEMIIEN DE RATS ADULTES ET AGES. ....	119
FIGURE 38: EFFET D'UNE INJECTION AIGUË DE NRG1 SUR LES RATIOS DE PHOSPHORYLATION DES ERBBs DANS LE FOIE DE RATS ADULTES ET AGES. ....	120
FIGURE 39: EFFET D'UNE INJECTION AIGUË DE NRG1 SUR LES RATIOS DE PHOSPHORYLATION D'AKT DANS LE FOIE DE RATS ADULTES ET AGES.....	121
FIGURE 40: EFFET D'UNE INJECTION AIGUË DE NRG1 SUR LES RATIOS DE PHOSPHORYLATION D'AKT DANS LE FOIE DE RATS ADULTES ET AGES.....	122
FIGURE 41: EXPRESSION DE LA NRG1 DANS LE MUSCLE SQUELETTIQUE (GASTROCNEMIIEN) DE RATS ADULTES ET AGES. ....	133
FIGURE 42: EXPRESSION ET RATIOS DE PHOSPHORYLATION DES ERBBs DANS LE GASTROCNEMIIEN DE RATS ADULTES ET AGES. ....	134
FIGURE 43: EFFET D'UN EXERCICE AIGUE SUR LE CLIVAGE DE LA NRG1 DANS LE MUSCLE SQUELETTIQUE DE RATS ADULTES ET AGES. ....	135
FIGURE 44: EFFET D'UN EXERCICE AIGUE SUR LES RATIOS DE PHOSPHORYLATION D'ERBB4 DANS LE GASTROCNEMIIEN DE RATS ADULTES ET AGES.....	137
FIGURE 45: EXPRESSION D'ADAM17 DANS LE GASTROCNEMIIEN DE RATS ADULTES ET AGES.....	138
FIGURE 46: EXPRESSION DE TIMP3 DANS LE GASTROCNEMIIEN DE RATS ADULTES ET AGES. ....	139
FIGURE 47: EXPRESSION DES PROTEINES DU COMPLEXE T-Secretase DANS LE GASTROCNEMIIEN DE RATS ADULTES ET AGES. ....	141
FIGURE 48: EXPRESSION BASALE DES ERBBs DANS LE COEUR DE RATS ADULTES ET AGES. ....	156
FIGURE 49: EXPRESSION BASALE DES PROTEINES DE REGULATION DES ERBBs DANS LE COEUR DE RATS ADULTES ET AGES.....	157
FIGURE 50: EFFET D'UNE INJECTION AIGUE DE NRG1 SUR LES RATIOS DE PHOSPHORYLATION DES ERBBs DANS LE COEUR DE RATS ADULTES ET AGES. ....	159
FIGURE 51: EFFET D'UNE INJECTION AIGUË DE NRG1 SUR LES RATIOS DE PHOSPHORYLATION D'AKT ET ERK1/2 DANS LE COEUR DE RATS ADULTES ET AGES. ....	160

---

# LISTE DES ACRONYMES

INSEE : Institut national de la statistique et des études économiques

NRG1: Neuregulin 1

ErbBs: erythroblastic leukemia viral oncogene (homologue)

EGF: Epidermic growth factor

HER2 = Erbb2

NDF : Neu differentiation Factor

ARIA: Acetylcholine Receptor Inducing Activity

GGF: Glial Growth Factor

SMDF: Sensory and Motorneuron derived factor

COOH: Site carboxyl terminal

TACE: TNF $\alpha$  conversion enzyme

ADAM 17 = TACE

TNF $\alpha$ : Tumor necrosis factor alpha

ADAM 19 = BACE

BACE: beta-site-APP cleaving enzyme

PKC : Protein kinase c

CamK : kinase dépendante du calcium

MAPK: Mitogen activated protein kinase

GPCRs: G protein coupled receptor

CRD : Cystein Rich Domain

NH2 : groupement amino-terminal

L(n) : Ectodomaine riche en leucine

CR(n) : Ectodomaine riche en cystéine

RTK : récepteur tyrosine kinase

ATP : Adénosine triphosphate

Ras/MAPK : cascade de signalisation

PLC $\mu$ 1/PKC : cascade de signalisation

P3K/AKT : cascade de signalisation

STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription

JAK2: Janus tyrosine kinase 2  
ITK: inhibiteur de l'activité tyrosine kinase  
YAP: Yes associated protein  
ARNm: Acids Ribo Nucléiques messagers  
HIF $\alpha$ : hypoxia-inducible factors  
Grb : Growth factor receptor-bound protein  
KO : knock out (gène)  
NMJ : jonction neuromusculaire  
AChr : Récepteur à l'acétylcholine  
MA : Maladie d'Alzheimer  
NMDA : N-methyl D-aspartate  
ADN : Acide DésoxyriboNucléique  
IMC : Indice de masse corporelle  
HOMA : Homeostasis Model Assessment  
QUICKI :Quantitative Insulin Sensitivity Check Index  
IR : récepteur insuline  
BCAA : Branched Chain Amino Acids  
IGF1 : Insulin like growth factor 1  
L6 ou C2C12 : modèles de cellules musculaires en culture  
ARIA : Acetylcholine Receptor Inducing Activity  
DMD :Duchenne Muscular Dytrophy  
NRF2 :NFE2L2 ou Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2  
FOXO3 : Forkhead Box O3  
SEP : sclérose en plaque  
IL10 : Interleukin 10  
NCHS : National Center for Health Statistics  
HVG : Hypertrophie Ventriculaire Gauche  
VTD : Volume télédiastolique  
VO2max : Débit maximal d'Oxygène consommé

CEC : Couplage Excitation Contraction  
RS : Réticulum Sarcoplasmique  
SERCA : Sarco Endoplasmic Reticulum Calcium transport ATPase  
Bcl-2 : B-cell lymphoma 2  
AC5 : adenylyl cyclase 5  
NO : oxyde nitrique  
eNOS : oxyde nitrique synthase endothéliale  
TASTUZUMAB : anticorps monoclonal dirigé contre ErbB2  
PKG : protein kinase G  
OGTT : test de tolérance orale au glucose  
VEH : véhicule (solution saline)  
AUC : aires sous courbes  
HIRI : indice de résistance hépatique à l'insuline  
MISI : Indice de sensibilité musculaire à l'insuline  
Hz : Herz  
BSA (dosage protéine) : albumine de sérum bovin  
mM : mMolaire  
NaCl : chlorure de sodium  
EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid  
HCl : hydrogen chloride  
PVDF : Polyvinylidene fluoride ou polyvinylidene difluoride  
TBST : Tris-Buffered Saline  
UV : Ultra violets  
Kda (poids moléculaire): kilodalton  
TIMP3 : TIMP Metallopeptidase Inhibitor 3  
PEN-2 : presenilin enhancer 2  
EDL : extensor digitorum longus  
ICD : fragment soluble cytoplasmique  
WWOX : WW Domain Containing Oxidoreductase

Er $\alpha$  : Estrogen receptor alpha  
P53 : Tumor protein p53  
ERRFI1 : ERBB receptor feedback inhibitor 1  
TOB1 : transducer of ErbB-2.1  
EBP1 : ErbB-3 proteinj inhibitor 1  
Erk1/2 : Extracellular signal-regulated kinases  
FAK : Focal Adhesion Kinase  
ADF : alternate day fasting  
IRS(n) : substrat du récepteur à l'insuline  
Glut4 : Transporteur de glucose 4  
Gs3k : glycogene synthase kinase 3  
HGP : production hépatique de glucose  
PGC1 : peroxisome proliferator activated receptor coactivator  
Ca<sup>2+</sup> : calcium  
Hba1c : hemoglobine glycquée  
L6E9 : cellule musculaire  
PDK1 : 3-phosphoinositide dependent protein kinase 1  
pM :picoMolaire  
PPAR :Peroxisome proliferator-activated receptor  
CAMK2 : calcium / calmoduline kinase 2  
AMPK : adénosine monophosphate kinase  
ST : force spécifique  
AP : activité physique  
FAK : focal adhesion kinase  
mTOR:mammalian target of rapamicyn

---

# INTRODUCTION GENERALE

« La vieillesse bien comprise est l'âge de l'espérance. »

*Victor Hugo*

L'espérance de vie à la naissance et l'espérance de vie à 65 ans ont considérablement augmenté dans les pays industrialisés (Le Gall et Ardaillou, 2009). La première depuis le début du XX<sup>ème</sup> siècle liée à la diminution de la mortalité infantile et à l'amélioration des conditions d'hygiène, la seconde, plus récemment, du fait d'une diminution générale de la morbidité à un âge avancé. Cette évolution permet à bon nombre de personnes âgées de vivre cette période de la vie sans incapacités majeures. On est loin de l'«état d'oubli profond où l'homme se trouve sans dents, sans yeux, sans goût, sans rien» décrit par Shakespeare dans « Comme il vous plaira ».

Conséquence de cela, la proportion des personnes âgées dans la population française ne cesse d'augmenter. En effet, alors qu'en 2005 un français sur cinq avait plus de 60 ans, l'INSEE prédit pour 2050 que cette catégorie d'âge représentera un tiers de la population totale. Ainsi, en l'espace de 45 ans le nombre de personnes âgées de 60 ans ou plus aura pratiquement doublé (+80%). Les chiffres sont encore plus spectaculaires si l'on considère les personnes de 85 ans et plus, dont le nombre va pratiquement quadrupler passant, selon les estimations, de 1,1 à 4,2 millions<sup>1</sup>. Ces bonnes nouvelles sanitaires ont toutefois un pendant social puisque les personnes âgées constituent une tranche de la population générant plus de dépenses de santé. A titre d'exemple, la dépense de santé annuelle double en 30 ans entre une personne de 20 ans et de 50 ans (1000€ à 2000€) mais elle triple dans le même laps de temps entre une personne de 50 ans et 80 ans (6000€)<sup>2</sup>.

Le processus de vieillissement est éminemment complexe et échappe encore à notre compréhension même si diverses théories biologiques, telle que la populaire hypothèse radicalaire, tentent d'en définir les contours mécanistiques. Par ailleurs, deux visions se distinguent : une approche évolutionniste qui place ce processus dans un continuum nécessaire à la propagation de l'espèce et une approche physiologiste qui considère le vieillissement comme la résultante d'une série d'altérations minimales au fil du temps. Quoiqu'il en soit le vieillissement est à la fois syndromique et systémique car aucun des grands systèmes physiologiques n'est

---

<sup>1</sup> INSEE : Projections de population 2005-2050. Vieillesse de la population en France métropolitaine. *Isabelle Robert-Bobée*. 2007.

<sup>2</sup>Rapport ministériel : L'état de santé de la population en France - Suivi des objectifs annexés à la loi de santé publique. *sous la direction de Sandrine Danet*. 2011.

épargné. Dans ce contexte, la prise en charge d'une personne âgée devrait être systématiquement considérée comme partie d'un tout. Or, il est courant d'observer un traitement pharmacologique combinant de multiples molécules à objectif unique. Cette pratique a pour corolaire une prévalence augmentée des interactions médicamenteuses chez la population âgée et par conséquent des répercussions en termes de santé publique (Hines et Murphy, 2011). Ces constatations valorisent légitimement des prises en charge comportementales comme l'alimentation ou l'activité physique connues pour agir sur l'ensemble de l'organisme. Toutefois, dans une perspective pharmacologique, certaines protéines d'origine humaine et dont l'expression ainsi que l'action sont relativement ubiquitaires constituent de potentielles voies d'investigation prometteuses.

Parmi ces dernières, la NRG1 et ses récepteurs, les ErbBs, représentent des cibles intéressantes par l'étendue des rôles physiologiques de cette voie. L'embryogenèse cardiaque, musculaire ou nerveuse de même que les cancers, la maladie d'Alzheimer, la sensibilité à l'insuline ou encore la schizophrénie sont autant de champs d'investigations impliquant ces protéines. Pressentie comme l'un des futurs traitements de l'insuffisance cardiaque, la NRG1 fait l'objet de publications internationales à très haut impact dans cette thématique et plusieurs essais cliniques sont actuellement en cours. Cependant, malgré une prévalence caractéristique chez les personnes âgées de pathologies comme les cancers, le diabète de type 2 ou l'insuffisance cardiaque, la relation entre la voie NRG/ErbBs et le vieillissement n'a pratiquement pas fait l'objet d'investigations. Pourtant, une relation forte, indépendante de la phylogénie, a été trouvée entre la durée de vie de certaines espèces de mammifères et le taux plasmatique de NRG1 ou l'expression d'ErbB4 dans le cervelet (Dickerson et al, 2009; Edrey et al, 2012). Cette observation suggère que la NRG1, par ses effets spécifiques sur la fonction cérébrale ou dans l'ensemble de l'organisme, pourrait être un déterminant majeur de la longévité des mammifères (Edrey et al, 2012).

Tout au plus, nous savons que le vieillissement module la voie ErbB chez *Caenorhabditis elegans* (He et al, 2014) et que la baisse progressive de l'expression d'ErbB4 liée à l'âge a été observée dans le mésencéphale ventral de rats (Dickerson et al, 2009). Egalement, dans le cadre du vieillissement cardiaque, la restauration de la voie NRG1/ErbB a été suggérée comme médiateur des effets positifs de la

restriction énergétique (Rohrbach et al, 2006). Une intervention qui est par ailleurs connue pour améliorer l'homéostasie du glucose, la sensibilité à l'insuline et surtout ... la durée de vie (Yamaza et al, 2002).

Le travail de recherche présenté dans ce manuscrit s'est donc intéressé à la NRG1 et à trois fonctions particulièrement affectées dans le vieillissement pour lesquelles cette protéine posséderait un fort potentiel thérapeutique. Les protocoles expérimentaux réalisés ont ciblé l'homéostasie du glucose, la fonction cardiaque et la sarcopénie. Par ailleurs, ces organes sont en étroite interaction les uns avec les autres, la dysfonction de l'un d'entre eux pouvant être cause ou conséquence de l'altération des deux autres.

La thématique de fond de ce travail est celle du potentiel thérapeutique de l'exercice physique, notamment par le biais des myokines. Ces protéines libérées par le muscle durant l'exercice sont à même d'agir au niveau systémique ce qui confère au muscle un rôle endocrine d'un intérêt grandissant (Pedersen et Febbraio, 2012). Or, depuis une dizaine d'années un faisceau d'indices tend à inclure la NRG1 parmi ces myokines (Guma et al, 2010).

Dans un premier temps, au sein d'une revue de la littérature, la voie de la NRG1 et ses différentes fonctions biologiques seront détaillées. Les données scientifiques convergentes entre rôles de la NRG1 et atteintes physiopathologiques liées au vieillissement seront ensuite présentées. Ce parallèle entre NRG1 et altérations physiologiques liées à l'âge sera développé sur l'homéostasie du glucose ainsi que sur la fonction cardiaque et musculaire.

Dans un second temps, les résultats des différentes investigations seront présentés. En premier lieu, nous avons déterminé l'effet de la NRG1 sur l'homéostasie du glucose en intégrant les signalétiques cellulaires musculaires et hépatiques. L'effet de la contraction musculaire sur la libération de NRG1 a ensuite été étudié. Et enfin nous présenteront les effets de l'injection de NRG1 au niveau cardiaque. Bien entendu, pour chaque investigation, nous avons comparé un groupe de rats adultes à un groupe de rats âgés.

Une discussion générale incluant des perspectives conclura ce manuscrit. Nous verrons ce qu'apportent nos résultats au potentiel thérapeutique de la NRG1 ainsi qu'à sa régulation par l'exercice, dans un contexte de vieillissement.

---

# INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

# 1 LA VOIE NRG1/ERBBS

Notre sujet d'étude, la NRG1 type 1  $\beta$ 2 est une isoforme, d'un type, d'une protéine, dérivée du gène *NRG1*. Les différents types de NRG1 appartiennent à la plus grande sous-classe de facteurs de croissance de la famille des facteurs de croissance épidermiques (EGF) : les NEUREGULINES (Massague et al, 1993; Falls 2003; Breuleux et al, 2007). Le gène *NRG1* et ses produits furent les premiers à être découverts au début des années 1990. Par la suite, cinq gènes additionnels ont été découverts (*NRG2*, *NRG3*, *NRG4*, *NRG5* et *NRG6*) (Figure 1). Chaque gène *NRG* produit de multiples isoformes différentes par épissages alternatifs (exemple : >30 pour *NRG1* et >15 pour *NRG3*) (Kao et al, 2010; Mei et Xiong, 2008).

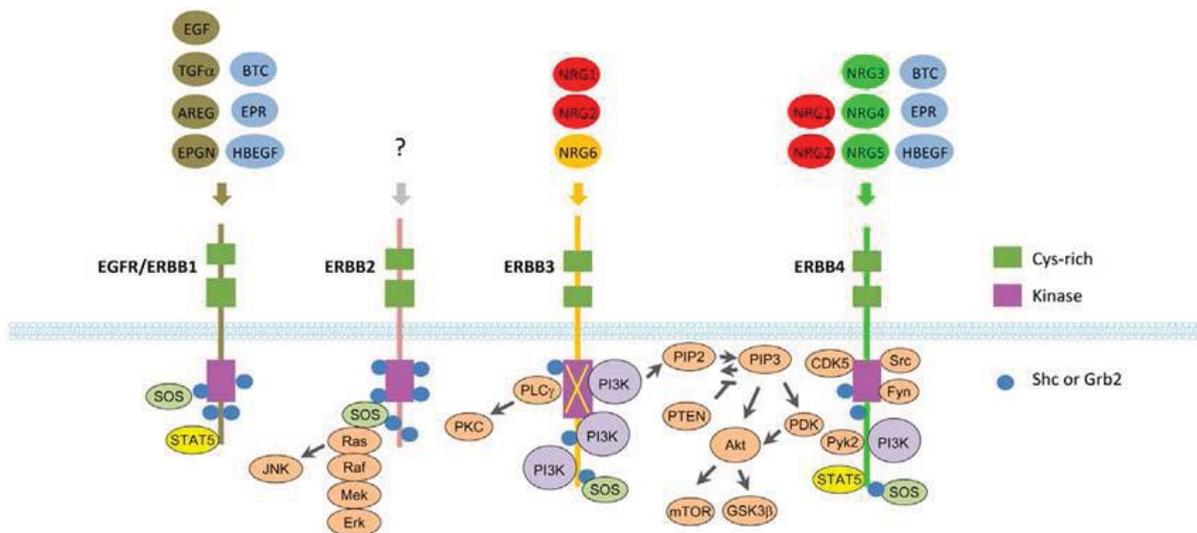


FIGURE 1: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA VOIE NRG/ERBB (D'après Mei et Nave, 2014).

Les neurégulines appartiennent à la famille des facteurs de croissance EGF. Ils existent six gènes *NRGs*, de 1 à 6, et toutes les isoformes contiennent un domaine EGF caractéristique de cette famille tandis que les autres parties des protéines sont hautement variables. Le domaine EGF des neurégulines est appelé EGFc et est codé par l'exon E130. Ce domaine est essentiel à l'activation des ErbB3 et/ou ErbB4 qui peuvent ensuite s'hétérodimériser avec les deux autres ErbB ou s'homodimériser dans le cas d'ErbB4.

La *NRG1* est une protéine qui médie des interactions autocrines et paracrines dans de nombreux organes. Le mode d'action endocrine a également été suggéré mais reste à explorer (Moondra et al, 2009). La plupart de ses isoformes est synthétisée sous forme de protéines transmembranaires qui exposent le fragment

biologiquement actif de type EGF dans l'espace extracellulaire (Wen et al, 1994). La partie extracellulaire peut ensuite être clivée pour libérer le fragment EGF qui va ensuite se comporter comme un ligand pour ses récepteurs cibles : les ErbBs (initialement nommés ainsi à cause de leur homologie avec le produit du gène viral de l'érythroblastose « v-erbB »). Cette fixation va entraîner la formation d'homo ou d'hétérodimères d'ErbBs qui à leur tour activent de nombreuses voies de signalisation intracellulaires (Figure 1 ; Mei et Nave, 2014).

La présente revue de synthèse va s'attacher à décrire les éléments constitutifs de la voie NRG1/ErbBs ainsi que leur mode d'action. La NRG1 et surtout les ErbBs sont des protéines pour lesquelles la littérature scientifique est particulièrement abondante. L'objectif ne sera donc pas l'exhaustivité mais plutôt la mise en perspective des principales caractéristiques physiologiques de cette voie permettant au lecteur la compréhension du travail de recherche réalisé.

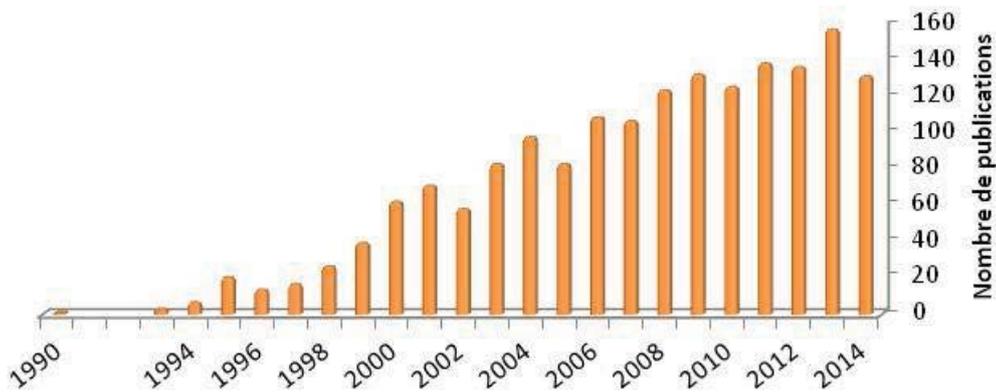
Dans une première partie, les caractéristiques structurales et fonctionnelles de la NRG1 et des ErbBs seront successivement décrits. Ensuite, une synthèse des principaux rôles physiologiques de cette voie sera délivrée avec une emphase sur son rôle durant la phase embryonnaire. Enfin, le cas de différentes implications physiopathologiques sera décrit pour donner une perspective clinique complémentaire aux travaux décrits dans ce manuscrit.

## 1.1 LA NEUREGULINE 1 (NRG1)

### 1.1.1 BREF HISTORIQUE

Les premières protéines NRG1 ont été mises en évidence au cours des années 1992 et 1993 par quatre équipes parmi lesquelles trois identifiaient la NRG1 de type 1. Les deux premières équipes étaient à la recherche d'activateurs de l'oncogène-récepteur HER2 (ErbB2) fortement surexprimé dans les cellules de carcinome mammaire (Holmes et al 1992 ; Peles et al, 1992 ; Wen et al, 1992). Ces travaux sont à l'origine de deux terminologies : Héreguline, couramment usitée dans les publications de cette époque, ainsi que NDF (Neu Differentiation Factor) (Peles et al, 1992). Par ailleurs, il sera montré plus tard que la NRG1 interagit en réalité avec ErbB3 ou ErbB4 qui ne se dimérisent qu'ensuite avec ErbB2 pour permettre son activation (Yarden et al, 2001). (Falls et al, 1993) furent la troisième équipe à identifier la NRG1 de type 1 en travaillant sur l'expression des récepteurs à l'acétylcholine dans les jonctions neuromusculaires (Falls et al, 1993). Ils lui donnèrent alors le nom d'ARIA (Acetylcholine Receptor Inducing Activity) (Falls et al, 1993). Enfin, suite à la recherche d'un facteur stimulant la prolifération des cellules de Schwann, la NRG1 de type 2 a été identifiée et reçut l'appellation GGF (Glial Growth Factor) (Goodearl et al, 1993 ; Marchionni et al, 1993).

Deux ans après la découverte de GGF (NRG1 type 2), un cinquième et dernier nom a été attribué à la NRG1. L'isoforme isolé appartenait au 3<sup>ème</sup> type de la classification des isoformes de NRG1, particulièrement exprimé dans les neurones sensoriels et moteurs ce qui fut à l'origine du terme SMDF (Sensory and Motor-neuron Derived Factor) (Ho et al, 1995). L'attrait scientifique pour ces différentes protéines s'est accru depuis de manière exponentielle avec l'intérêt porté à leur effet cardiaques, nerveux et plus récemment dans le muscle squelettique (Figure2 ; Mei et Nave, 2014 ; Parodi et Kuhn, 2014 ; Guma et al, 2010).



**FIGURE 2: EVOLUTION CHRONOLOGIQUE DES PUBLICATIONS INDEXEES *PUBMED* POUR "NEUREGULIN 1"**

Le nombre de publications sur la NRG1 est en constante augmentation depuis le début des années 1990 du fait, notamment, de ses propriétés dans le système nerveux et le cœur.

L'éventail des fonctions de la NRG1 est majoritairement dû à une grande variabilité dans sa structure du fait d'un épissage alternatif prolifique des ARNm du gène source.

## 1.1.2 UN SEUL GENE MAIS DE MULTIPLES PRODUITS

### 1.1.2.1 UNE NOMENCLATURE COMPLEXE

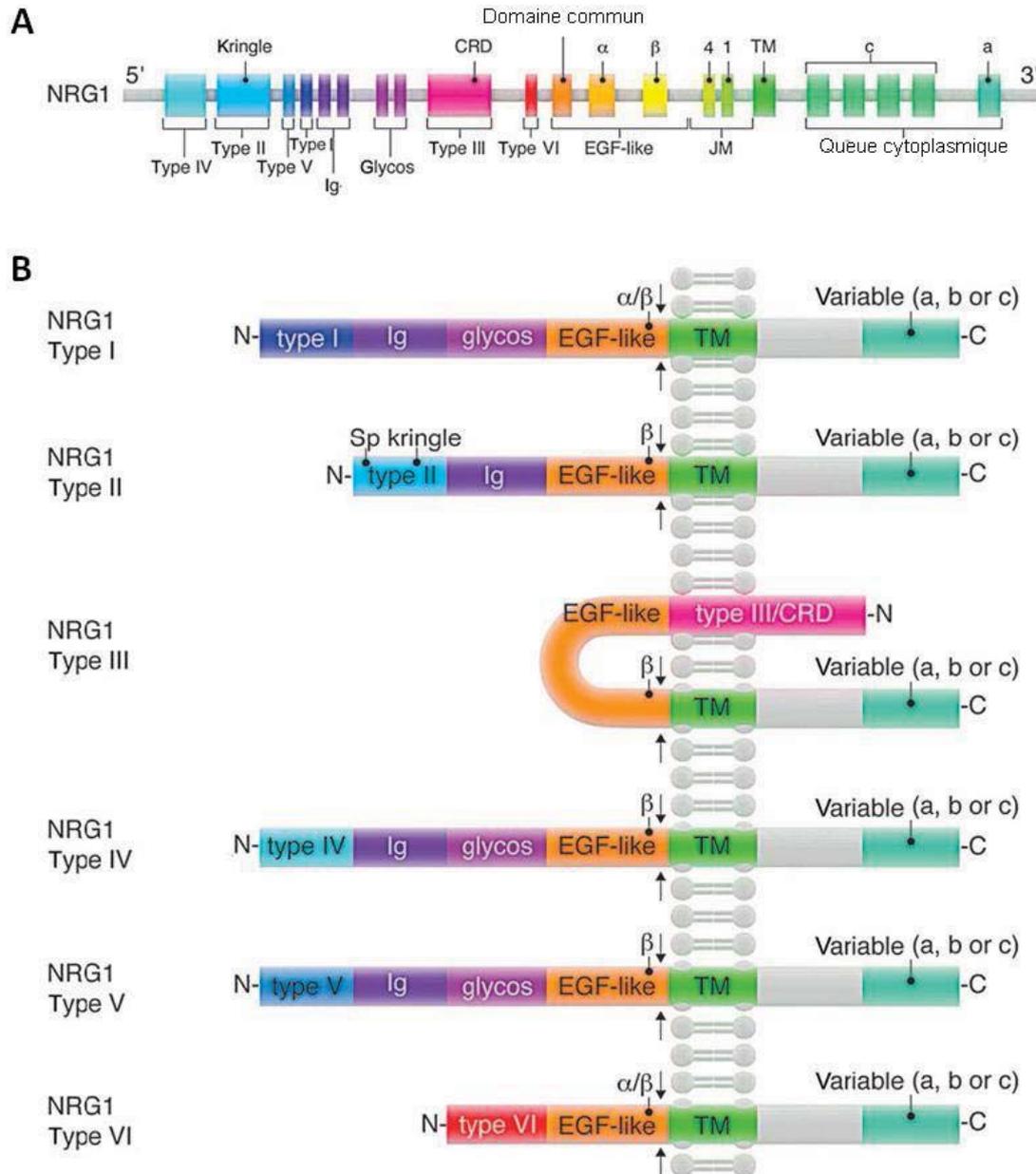
Le gène *NRG1*, situé sur le bras court du chromosome 8, est long d'environ 1,4 mégabases dont seulement 0,3% encodent pour des protéines (Buonnano et Fischbach, 2001). Les produits géniques de *NRG1* ont une signature caractéristique pour le domaine EGF appelé EGFc (commun aux autres NRGs) qui les différencie des autres membres de la famille des facteurs de croissance épidermiques. Ce domaine est codé par l'Exon E130 (Harrison et Law, 2006). A ce jour, il a été dénombré une trentaine d'isoformes produits du gène *NRG1* (Fleck et al, 2012). Ces dernières présentent plusieurs caractéristiques structurales importantes au regard de leur activité biologique : le variant du domaine EGF, la séquence N-terminale (type 1 à 6) et leur ancrage membranaire (simple ou double) (Figure 3 ; Wei et Xiong, 2008).

Le fragment EGF, présent au niveau extracellulaire, est placé après l'extrémité N-terminale et comporte 45 à 55 acides aminés. Chaque tissu va donc produire ses propres variants comme les cellules micro-endothéliales cardiaques et les

cardiomyocytes qui produisent au minimum 3 isoformes contenant le variant  $\alpha$  du fragment EGF et 8 contenant le variant  $\beta$  (Lemmens et al, 2006).

La catégorisation des isoformes de NRG1 du type I au type VI a été réalisée sur la base de leurs différences au niveau de la région N-terminale. Ainsi, les isoformes de NRG1 de type I, initialement connus sous les noms ARIA, Héreguline et NDF ont un domaine de type immunoglobuline (Ig). La NRG1 de type 2, ou GGF, possède elle aussi le domaine Ig mais son extrémité présente également un domaine kringle (en référence à une spécialité culinaire scandinave du même nom). La NRG1 de type 3, ou SMDF, possède quant à elle un domaine riche en cystéine et un domaine transmembranaire au sein de ce dernier. Les NRG1 de type 4, type 5 et type 6 sont quant à elles similaires à la NRG1 de type 1 et possèdent un domaine Ig (Parodi et Kuhn, 2014).

De plus, des variations dans le site carboxy-terminal (COOH) du domaine EGF ( $\alpha$ ,  $\beta$  ou  $\gamma$ ) ainsi que dans le site de liaison (1, 2, 3, and 4) et enfin la longueur du domaine intracellulaire (a, b, and c) complètent la nomenclature (ex : NRG1  $\beta$ 1a).



**FIGURE 3: SCHEMA DU GENE *NRG1* ET DE LA STRUCTURE DES ISOFORMES DE NEUREGULINE1 (NRG1).**

(D'après Parodi et Kuhn. 2014).

**A** Loci génétiques du gène *NRG1*. **B** Composition des isoformes des protéines NRG1. Les flèches indiquent les sites de clivages protéolytiques potentiels. En bleu ciel l'extrémité C-terminale (-C), en vert le domaine transmembranaire (TM), en orange le domaine bioactif EGFc caractéristique des protéines de cette famille (EGF-like), en violet clair le domaine de glycosylation potentiel (glycos), en rose le domaine riche en cystéine de la NRG1 de type 3 (CRD), les NRG1 de type 1, 2, 4, 5 et 6 diffèrent en fonction de leur domaine N-terminale (type I, II, IV, V et VI).

### 1.1.2.2 UN ROLE PHYSIOLOGIQUE DEPENDANT D'UNE ACTIVITE PROTEOLYTIQUE

Une fois synthétisée, la NRG1 va s'ancrer (la plupart du temps) dans la membrane plasmique. Cet ancrage réalisé, son activité biologique est dépendante d'un clivage

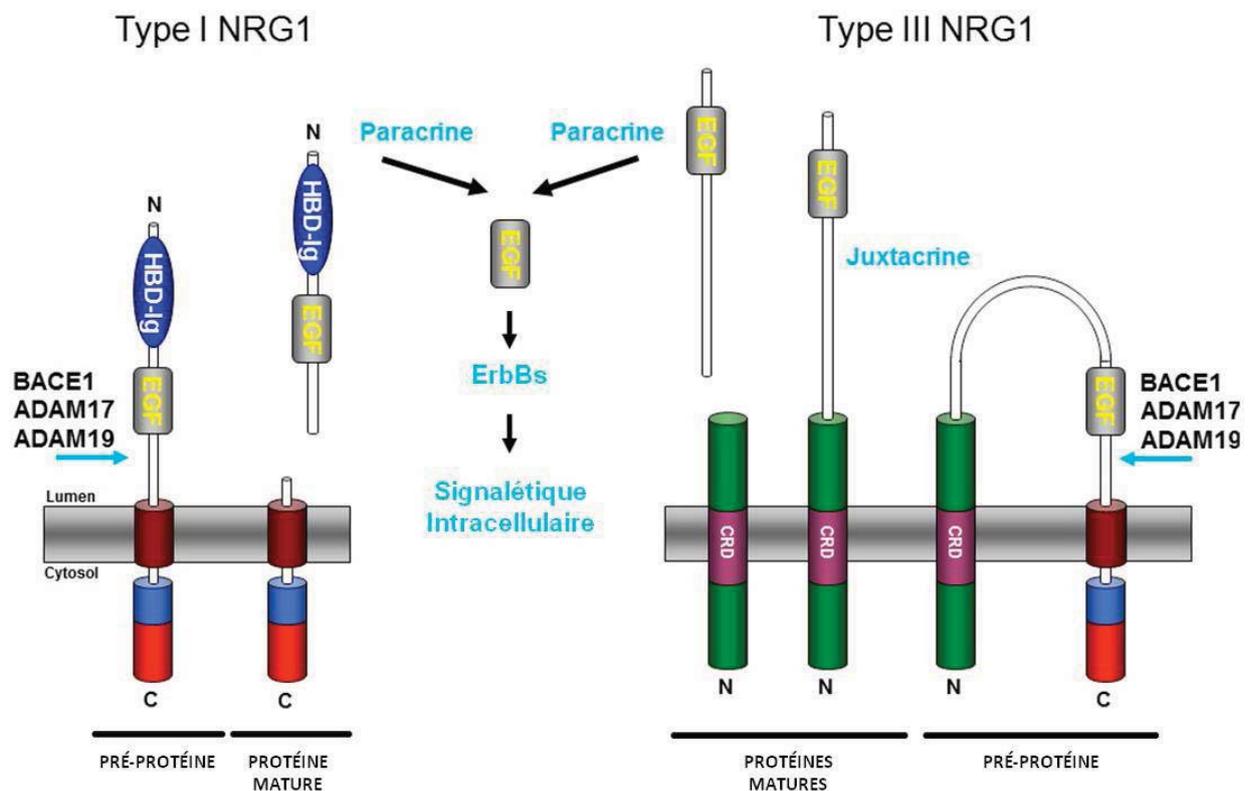
protéolytique. La protéine transmembranaire dans sa forme complète est appelée pré-protéine (ou pro-NRG1) tandis qu'après clivage la protéine résiduelle portant le fragment bioactif est appelée protéine mature. Mis à part pour la NRG1 de type 3 (*cf. Paragraphe suivant*) c'est la solubilisation du fragment EGF qui permet à la NRG1 d'exercer ses actions de manière autocrine, paracrine et endocrine (Figure 4). Toutes les protéines NRG1 matures possédant le domaine EGF sont des ligands pour les récepteurs ErbBs, mais avec des spécificités et des affinités distinctes pour ErbB3 et ErbB4 (ErbB2 est inapte pour la fixation d'un ligand) (Ballinger et al, 1998).

La libération au niveau extracellulaire de la NRG1 soluble à partir du précurseur membranaire se produit par l'action des protéases de la surface cellulaire. Le domaine EGF présent dans les fragments libérés est suffisant à lui seul pour fixer et activer les ErbBs. Dans des conditions de repos, la plupart des pro-NRG1 biosynthétisées s'accumulent à la membrane plasmique, et les activités protéolytiques qui agissent sur ces facteurs sont très modérées (Montero et al, 2000). Cependant, ces activités protéolytiques peuvent être régulées positivement et provoquer l'effusion de NRG1 solubles (Diaz-Rodriguez et al, 2000). Des études sur les mécanismes et les entités moléculaires qui participent à la solubilisation des pro-NRG1s ont indiqué que ce processus implique plusieurs activités protéolytiques différentes.

L'une des protéases impliquées est TACE (TNF $\alpha$  Conversion Enzyme), également appelée ADAM17. Les expériences menées dans des cellules déficientes en activité TACE ont indiqué que la libération de l'isoforme transmembranaire pro-NRGa2c est bloquée dans ces cellules (Montero et al, 2000). Ces études ont été complétées par d'autres qui ont étudié le rôle d'ADAM19/meltrin-h (Shirakabe et al, 2001) ou BACE1 (Willem et al, 2006) dans la libération des fragments bioactifs de NRG1. Les mécanismes d'activation de ces protéases restent encore à définir précisément. Toutefois, la stimulation de plusieurs kinases intracellulaires, telles que la PKC (protéine kinase C), les CamK (kinases dépendantes du calcium), ou les MAPK (protéines kinases mitogéniques activées) telles que ERK1/2 et p38, a été largement étudiée (Montero et al, 2000 ; Montero et al, 2002 ; Shirakabe et al, 2001). Une augmentation des activités de certaines de ces kinases dans la cellule est donc un facteur déterminant qui provoque l'activation des protéases clivant la NRG1. A noter que d'autres phénomènes cellulaires peuvent aussi être à l'origine de l'activation de

ces métalloprotéases. Par exemple, l'activation des récepteurs GPCRs (G Protein Coupled Receptor) par des ligands tels que l'endothéline-1, la bombésine, la thrombine, l'acide lysophosphatidique ou encore l'angiotensine peut permettre l'activation des protéases de la famille ADAM (Eguchi et al, 1998; Prenzel et al, 1999; Gschwind et al, 2001; Gschwind et al, 2002; Carpenter et al, 2000).

Quoiqu'il en soit, l'activation des métalloprotéases aboutit à un clivage permettant la mise à disposition du fragment bioactif EGF. Cependant, toutes les formes de NRG1 ne solubilisent pas ledit fragment suite à l'action protéolytique des protéases.



**FIGURE 4: COMPARAISON DES MODES D'ACTIONS DES NRG1 DE TYPE 1 ET 3**

(D'après Fleck et al, 2012).

La NRG1 de type 1 présente son extrémité N-terminale au niveau extracellulaire et doit subir un clivage protéolytique pour solubiliser son domaine EGF (action paracrine). La NRG1 de type 3 peut subir un premier clivage protéolytique qui expose son domaine EGF mais le produit est alors une protéine transmembranaire (action juxtacrine). Un deuxième clivage peut permettre à la NRG1 de type 3 de solubiliser son domaine EGF (action paracrine).

### **1.1.2.3 CAS PARTICULIER DE LA NRG1 DE TYPE 3**

Sur le plan biologique et structurel, il est intéressant de mettre en exergue la particularité des NRG1 de type 3 qui ne contiennent pas la séquence signal N-terminale alors remplacée par le domaine CRD (Falls 2003 ; Wen et al, 1994). Cette dernière séquence, qui définit les différents types de NRG1, est pourtant connue pour cibler les chaînes polypeptidiques naissantes de protéines depuis le réticulum endoplasmique vers l'espace extracellulaire ou la membrane plasmique. La partie hydrophobe du domaine CRD présente chez les NRG1 de type 3 a été identifiée à la fois comme un substitut à la séquence N-terminale et comme un ancrage transmembranaire (Wen et al, 1994). En effet, les NRG1 de type 3 ont un double ancrage membranaire qui leur confère un mode d'action juxtacrine. Ces isoformes semblent avoir un rôle prépondérant dans le système nerveux possiblement via ce mode d'action (Wolpowitz et al, 2000). Les NRG1 de type 3 sont une exception au sein de la famille EGF car les autres facteurs de croissance transmembranaires présentent tous cette séquence N-terminale avant l'extrémité NH2 (Massague et al, 1993).

Les fonctions biologiques de la NRG1 sont donc médiées par de multiples isoformes qui seront ensuite clivées par diverses métalloprotéases en fonction du contexte physiologique. Toutefois, le mécanisme cellulaire complet nécessite la fixation sur un des récepteurs ErbBs. Ces derniers vont constituer la troisième interface de réponse physiologique de la voie et, de part leurs particularités structurelles et fonctionnelles, augmenter encore l'éventail possible de signaux cellulaires engendrés.

## 1.2 LES RECEPTEURS ERBBS

La famille de protéines ErbBs comprend quatre récepteurs (ErbB1-4) et 13 ligands polypeptidiques extracellulaires, qui contiennent tous un domaine EGF (Figure 5). La duplication du gène ancestral et la spécialisation fonctionnelle a permis à cette famille de récepteurs d'assumer de nombreuses fonctions dans le développement et la maintenance de tissus spécifiques. Le réseau des récepteurs ErbBs est un des domaines les plus étudiés de la transduction du signal pour son rôle dans le développement et la physiologie du cancer y compris chez l'humain (Montero et al, 2008).

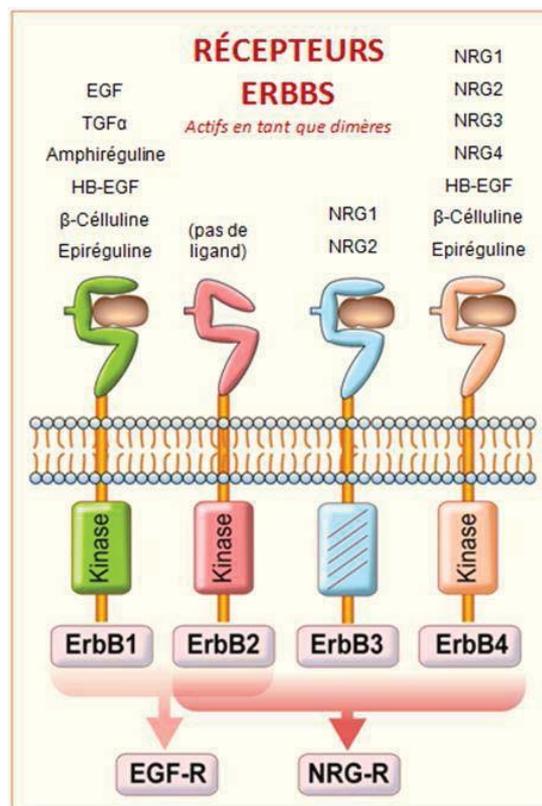


FIGURE 5: FAMILLE DES RECEPTEURS ERBBS ET LEURS LIGANDS. (D'après Guma et al. 2010)

La famille de récepteurs ErbB comporte quatre membres : ErbB1, ErbB2, ErbB3 et ErbB4. La NRG1 ne se fixe que sur ErbB3 et ErbB4, le domaine extracellulaire d'ErbB2 est constitutivement en conformation ouverte ce qui le rend inapte à fixer un ligand. La NRG1 n'est pas un ligand pour ErbB1. Toutefois les récepteurs ErbB1 et ErbB2 peuvent se dimériser avec ErbB3 et ErbB4 ayant fixé la NRG1. L'ErbB3 est particulier par son domaine tyrosine-kinase inactif, il peut toutefois être transphosphorylé lors de la dimérisation.

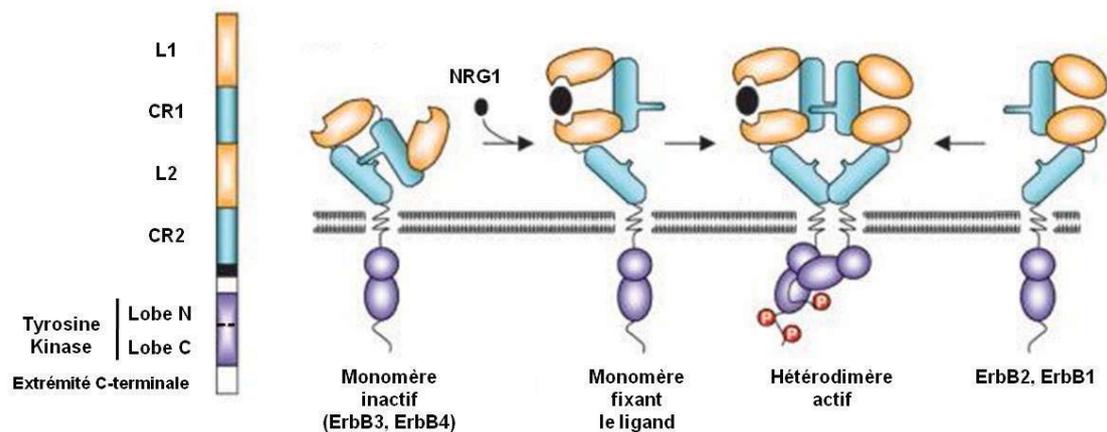
### **1.2.1 STRUCTURE**

Les ErbBs sont des glycoprotéines à chaînes transmembranaires constituées d'un ectodomaine extracellulaire de liaison au ligand, d'un domaine transmembranaire, d'une section juxtamembranaire courte, d'un domaine tyrosine kinase et enfin d'une queue C-terminale. L'ectodomaine de liaison au ligand est composé de quatre sous-domaines appelés L1 (riche en leucine), CR1 (riche en cystéine), L2 et CR2 (Figure 6). Le domaine CR1 contient une boucle  $\beta$  en épingle à cheveux essentielle dans la fonction de ces récepteurs. Bien qu'il soit considéré comme le groupe typique de la famille des récepteurs tyrosine kinase (RTK), un trait caractéristique important du réseau des ErbBs est que deux membres de la famille : ErbB2 (également connu sous le HER2/neu) et ErbB3, ne sont pas autonomes. ErbB2 n'a pas la capacité d'interagir avec un ligand facteur de croissance (Klaper et al, 1999), alors que l'activité kinase d'ErbB3 est défectueuse (Sierke et al, 1997).

### **1.2.2 MODE D'ACTION**

#### **1.2.2.1 DES RECEPTEURS UNIQUEMENT ACTIFS EN TANT QUE DIMERES**

La liaison du ligand soluble sur l'ectodomaine du récepteur favorise la formation d'homo et d'hétérodimères entre les récepteurs. La dimérisation du récepteur est essentielle pour l'activation du domaine tyrosine kinase intracellulaire et la phosphorylation de la queue C-terminale (Linggi et al, 2006). L'étude précise des structures d'ErbB3 et ErbB4 montre que, dans la forme inactive sans fixation du ligand, l'ectodomaine prend une conformation «captive» dans laquelle la boucle en épingle à cheveux  $\beta$  de CR1 interagit avec CR2, ce qui séquestre la boucle de dimérisation (Bouyain et al, 2005; Garrett et al, 2002). A l'inverse, il y a changement de conformation et le récepteur prend une forme élargie lorsque les domaines L1 et L2 de l'ectodomaine des ErbBs se lient à un fragment EGF ou au TGF- $\alpha$  (Figure 6). Ceci expose la boucle de dimérisation et permet une interaction des ectodomains des récepteurs.



**FIGURE 6: MODE D'ACTION DES ERBBS.**

*(D'après Wieduwilt et Moasser, 2008)*

La NRG1 est un ligand pour ErbB3 et 4. Cette fixation, sur les domaines L2 et L1, modifie la conformation tridimensionnelle du récepteur ce qui expose la boucle de dimérisation CR1 pour permettre la dimérisation avec ErbB2 ou ErbB1.

La conformation tridimensionnelle d'un dimère d'ErbBs oriente les ligands vers l'extérieur depuis la zone d'interaction des deux ectodomaines (Figure 6, Garrett et al, 2002). En accord avec son incapacité à fixer un ligand, l'ectodomaine d'ErbB2 se révèle tronqué et le récepteur est verrouillé dans une conformation ouverte prête à interagir avec d'autres récepteurs (Garrett et al, 2003). Cette conformation ouverte supprime le site de liaison potentielle d'un ligand en plaçant les domaines L1 et L2 dans une trop grande proximité.

En dépit de leur manque d'autonomie, ErbB2 et ErbB3 sont capables de se complexer en un hétéro-dimère ErbB2/ErbB3 ou avec d'autres récepteurs ErbBs et sont donc à même de générer des signaux cellulaires. ErbB1 et ErbB4 quant à eux peuvent être considérés comme des récepteurs pleinement fonctionnels. La liaison d'un ligand à l'ectodomaine des ErbBs et la dimérisation qui en découle induit des changements de conformation dans le domaine tyrosine kinase intracellulaire. On observe alors l'autophosphorylation des queues C-terminales. Lors de cette phosphorylation, la liaison de l'ATP s'effectue entre les deux lobes du domaine tyrosine-kinase et permet ainsi le déclenchement des voies de signalisations intracellulaires (Figure 6 ; Wieduwilt et Moasser, 2008). Les résidus de phosphotyrosine, soit directement, soit par l'intermédiaire d'autres protéines, activent

en aval différentes signalétiques intracellulaires telles que les voies Ras/MAPK, PLC $\gamma$ 1/PKC, PI3K/Akt ou encore STAT (Scaltriti et al, 2006).

Comme bien souvent en biologie, le processus d'activation des ErbBs décrit précédemment connaît des exceptions. En effet, la fixation directe du ligand EGF sur l'ErbB n'est pas systématiquement nécessaire.

### **1.2.2.2 ACTIVATION INDEPENDANTE D'UN LIGAND**

Dans ce cas de figure, l'activation du récepteur ErbB est d'origine intracellulaire et non extracellulaire comme avec le ligand EGF. Deux possibilités existent alors, d'une part via le récepteur à l'hormone de croissance et, d'autre part, via les récepteurs GPCR.

L'hormone de croissance et la prolactine ont montré leur capacité à stimuler respectivement l'ErbB1 et l'ErbB2 par un mécanisme intracellulaire. En effet, en se fixant à leur propre récepteur, ces hormones activent la protéine JAK2 (Janus tyrosine kinase 2) qui phosphoryle ensuite les ErbBs sans qu'ils n'aient fixé de ligand au niveau extracellulaire (Yamauchi et al, 1997 ; Yamauchi et al, 2000). Dans le cas des récepteurs GPCR, c'est la protéine c-Src qui va induire la phosphorylation de la queue c-terminale et la transactivation du récepteur (Biscardi et al. 1999). Ces interactions et combinaisons possibles sont malheureusement aussi un mécanisme par lequel certains cancers échappent aux effets des traitements inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase (ITK) (Sergina et al, 2007; Eguchi et al, 1998).

Qu'elle soit consécutive à la fixation d'un ligand ou initiée par d'autres mécanismes, l'activité des récepteurs ErbBs est régulée par plusieurs processus intracellulaires. En effet, ces protéines peuvent subir une endocytose participant à l'homéostasie de cette voie de signalisation.

### **1.2.2.3 TRAFIC INTRACELLULAIRE DES ERBBs**

#### **1.2.2.3.1 TRI ET RECYCLAGE ENDOSOMAL**

La durée et l'intensité de signalisation des ErbBs transmembranaires stimulés par des ligands extracellulaires sont régies par l'endocytose du récepteur. Ce mécanisme est caractérisé par un trafic membranaire et vésiculaire. Après que la fixation du ligand provoque l'endocytose, les ErbBs sont alors internalisés dans des

vésicules cytoplasmiques et donc retirés de la membrane plasmique (Sorkin et al, 2009). Outre l'atténuation du signal membranaire, ce mécanisme a d'autres fonctions. Le devenir du récepteur internalisé dans les endosomes se subdivise en trois possibilités. Tout d'abord, les ErbBs peuvent être recyclés à la surface de la cellule via les endosomes de recyclage ou par le biais d'une voie de recyclage directe. Deuxièmement, ils peuvent être orientés dans les endosomes tardifs et ensuite dégradés par les lysosomes. Enfin, un mode de signalisation additionnel a été découvert où les ErbBs, après l'endocytose, peuvent être transportés à partir de la surface cellulaire vers différents organites. La présence d'ErbB a été montrée au niveau de l'appareil de Golgi, du réticulum endoplasmique, des mitochondries et surtout au niveau nucléaire (Scott et al, 1993; Mosesson et al, 2008 ; Wang et al, 2010). Cette localisation nucléaire permet aux ErbBs d'influencer l'activité transcriptionnelle sans cascade de signalisation cytosolique.

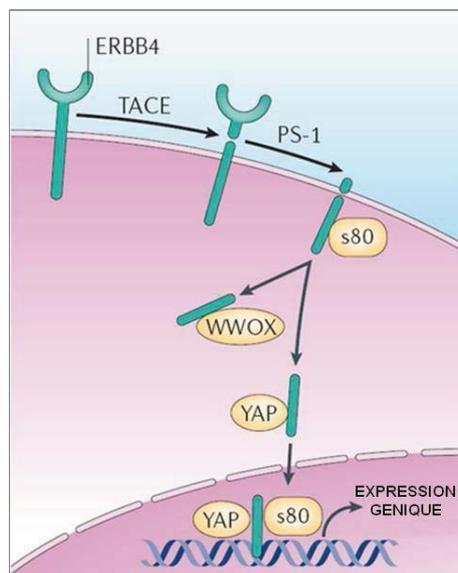
#### 1.2.2.3.2 SIGNALISATION NUCLEAIRE

L'étude de cette signalisation nucléaire des protéines ErbBs est par ailleurs prometteuse en physiopathologie humaine. En effet, il a été montré une corrélation négative entre pronostic de survie et taux nucléaires d'ErbB1 dans les cancers du sein (Lo et al, 2005). En outre, la localisation nucléaire des ErbBs stimule l'expression des gènes clés dans la biologie et la prolifération des cellules cancéreuses (Massie et al, 2006). Il a été trouvé au niveau nucléaire des formes totales d'ErbB1, d'ErbB2 et d'ErbB3 ainsi que des formes tronquées d'ErbB2 (constitutivement activées) ou d'ErbB4 (Extrémité C-terminale tronquée : s80, E4ICD) (Xie et al, 1994; Marti et al, 2000; Lin et al, 2001; Wang et al, 2004; Giri et al, 2005; Offterdinger et al, 2002; Koumakpayi et al, 2006; Anido et al, 2006; Ni et al, 2001). Le transport vers le noyau semble exiger trois groupes d'acides aminés basiques dans le domaine juxtamembranaire de tous les membres de la famille ErbB qui présentent cette fonctionnalité (Hsu et al, 2007).

Bien que tous les récepteurs ErbBs aient été localisés au niveau nucléaire, le récepteur ErbB4 est particulier par sa capacité à induire une transduction du signal directement au noyau via la solubilisation de son domaine intracellulaire.

### 1.2.2.3.3 CAS PARTICULIER DE LA SIGNALISATION NUCLEAIRE D'ERBB4

En effet, ErbB4 ne s'internalise pas dans les endosomes comme les autres ErbBs (Giri et al, 2005) mais est, au contraire, capable d'influencer directement la transcription par le biais de son domaine intracellulaire (Sanderson et al, 2006). Ce mécanisme serait induit par un clivage protéolytique nécessitant, au niveau extracellulaire, la fixation d'un ligand sur les deux ectodomains des récepteurs formant le dimère (Schlessinger et Lemmon, 2006).



**FIGURE 7: SCHEMA PROTOTYPIQUE DE LA SIGNALISATION NUCLEAIRE D'ERBB4.**

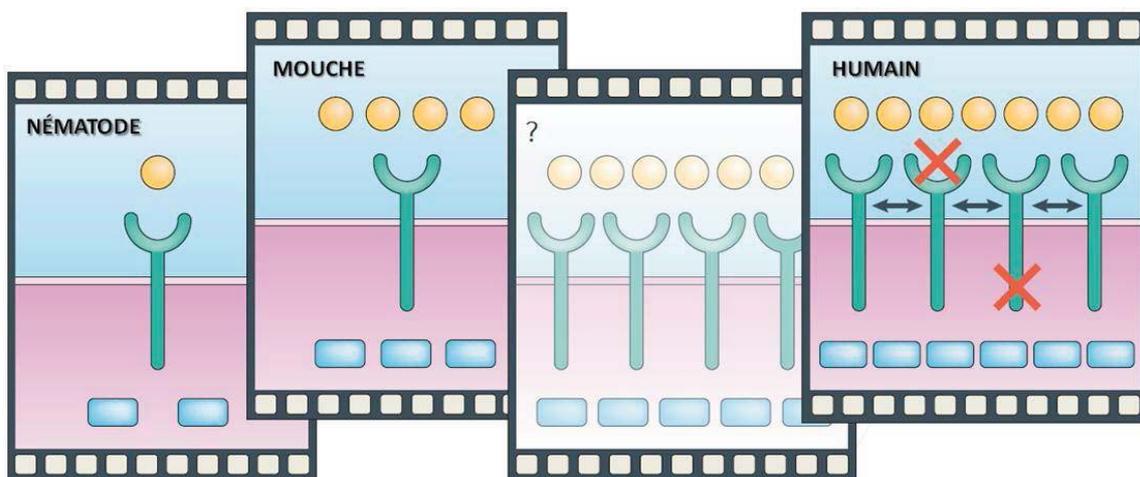
(D'après Citri et Yarden, 2006).

Le récepteur ErbB4 suite à la fixation d'un ligand peut être clivé au niveau extracellulaire par la métalloprotéase TACE/ADAM17. Puis le complexe des  $\gamma$ -sécrétases (PS-1 = Préséniline 1 ; Préséniline 2 ; APh-1 ; PEN-2 ; Nicastrine) va procéder à un deuxième clivage permettant la libération d'un fragment au niveau cytoplasmique (S80). Ce fragment va exercer ensuite une activité transcriptionnelle, en se complexant par exemple avec YAP (Yes Associated Protein), ou s'associer d'autres protéines (ex : WWOX) pour être dégradé.

ErbB4 présente deux formes d'épissages alternatifs de ses ARNm: JM-b, qui produit la forme standard, et JM-a, qui produit un ErbB4 susceptible de subir un double clivage (Elenius et al, 1997). La stimulation de la variante d'épissage JM-a d'ErbB4 par un ligand favorise le clivage protéolytique d'ErbB4 par la métalloprotéase TACE/ADAM17 à la surface extracellulaire. Ensuite, la Préséniline/ $\gamma$ -sécrétase clive ErbB4 en aval de son domaine transmembranaire ce qui libère dans le cytoplasme un fragment d'environ 80kd (Figure 7). Ce fragment est en réalité un dimère actif

contenant les domaines tyrosine kinase, il est appelé s80 (ou E4ICD) (Ni et al, 2001). Ce fragment s80 peut alors agir comme une protéine chaperonne de manière similaire à d'autres comme STAT5 (Komuro et al, 2003 ; Williams et al, 2004). Il a notamment été bien décrit la formation d'un complexe avec la protéine YAP (YES Associated protein) ce qui permet la translocation de cette dernière dans le noyau (Omerovic et al, 2004 ; Aqeilan et al, 2005). Plus récemment, il a été montré que le fragment intracellulaire d'ErbB4 interagissait avec HIF $\alpha$  dans des cellules de cancer du sein et permettait par ce biais leur survie *in vitro* (Paatero et al, 2012).

Les récepteurs ErbBs sont le produit d'une évolution structurelle et fonctionnelle complexe (Figure 8) comme en témoigne leurs particularités telles que la nécessité d'un partenaire de dimérisation, l'incapacité d'ErbB2 de fixer un ligand ou encore le domaine tyrosine kinase dysfonctionnel d'ErbB3. Cette complexité leur permet d'assurer un large éventail de fonctions physiologiques parmi lesquelles la prolifération, la survie, la différenciation cellulaire ainsi que la morphogénèse dans de nombreux tissus. Les nombreuses fonctions des ErbBs empruntent nécessairement de nombreuses voies de signalisation intracellulaires auxquelles nous allons nous intéresser dans la partie suivante.



**FIGURE 8: EVOLUTION D'UN RESEAU CELLULAIRE ETENDU.**

(D'après Citri et Yarden, 2006)

Les nématodes et les insectes expriment un seul orthologue d'ErbB. Le ligand LIN-3, de type EGF, se trouve chez les vers. Les insectes possèdent quatre ligands de stimulation et un ligand inhibiteur, Argos, qui se lie à leur orthologue d'ErbB. Les protéines de la famille ErbB chez les mammifères contrôlent l'organogénèse et la fonction dans de multiples tissus. L'hypothèse avancée est que la complexification du réseau s'est mise en place pour répondre à la complexification des organismes évolués que sont les mammifères.

### **1.2.3 DIVERS SIGNAUX INTRACELLULAIRES POTENTIELS**

De multiples voies de signalisation sont activées par les ErbBs et celles-ci ont été largement étudiées. En effet, les membres de la famille ErbBs sont capables d'activer les voies Ras/MAPK, PI3K/Akt, PLC $\gamma$ 1/PKC, STAT et la voie PAR6/PKC atypique (Yarden et al, 2001 ; Scaltriti et al, 2006). Cependant, le travail de recherche présenté dans ce manuscrit s'est préférentiellement focalisé sur deux voies de signalisation en particulier : la voie PI3K/AKT et la voie des MAPK. En effet, comme nous le verrons plus tard, les rôles physiologiques de la voie NRG1/ErbBs qui seront étudiés dans ce manuscrit sont médiés par les voies PI3K/AKT et MAPK (Guma et al, 2010 ; Pentassuglia et Sawyer, 2009).

#### **1.2.3.1 VOIE RAS/MAPK**

La phosphorylation en tyrosine des ErbBs libère des sites pour Grb2 et l'homologue de Src2 (Shc2) qui activent la voie Ras/Raf/MAPK et stimulent ainsi la prolifération cellulaire (Batzer et al, 1994; Lowenstein et al, 1992). ErbB1 et ErbB2 ont été les plus étudiés dans ce contexte du fait de leur surexpression récurrente dans de nombreux types de cancer (Montero et al, 2008). Toutefois, cette voie n'est pas limitée à ce rôle et l'activation des MAPK par les ErbBs s'est révélée nécessaire, entre autres, pour le développement des fuseaux neuromusculaires (Herndon et al, 2014) et la structure des cardiomyocytes (Akhtar et al, 2012).

#### **1.2.3.2 VOIE PI3K/AKT**

La voie PI3K/AKT, quant à elle, est importante pour la survie cellulaire ainsi que l'hypertrophie pathologique et non pathologique (Polivka et Janku 2014 ; Aoyagi et Matsui 2011 ; Glass 2010). Un haut niveau d'activation de cette voie est permis par la liaison directe de la sous-unité p85 de la PI3K à un récepteur ErbB activé. C'est ce qui se produit avec ErbB3 qui possède de nombreux sites de liaison à p85 (Schulze et al, 2005 ; Canto et al, 2004). Cette signalétique est impliquée dans les rôles d'ErbB3 dans le muscle squelettique (Canto et al, 2004 ; Hellyer et al, 2006), le foie (Kong et al, 2003) ou le système nerveux (Li et al, 2001). ErbB2 quant à lui active cette voie tout particulièrement au niveau cardiaque (Sysa-Shah et al, 2012) et parfois dans les poumons (Liu et al, 2004). La fixation de la NRG1 sur l'ErbB4 permet l'activation de PI3K en situation de stress physiologique dans le cœur (Fukazawa et

al, 2003) et le système nerveux (Xu et al, 2012). L'ErbB1 n'active que faiblement cette voie PI3K/Akt (Mattoon et al, 2004).

La complexité de structure et de fonction des ErbBs ainsi que celle de la NRG1 implique un large éventail de réponses cellulaires possibles pour cette voie. De ce fait, il est logique que cette dernière soit impliquée dans un grand nombre de fonctions physiologiques. Ces différents rôles vont être présentés succinctement dans la partie suivante de ce manuscrit.

## **1.3 FONCTIONS PHYSIOLOGIQUES DE LA VOIE NRG1/ERBB**

La voie NRG1/ErbB a été beaucoup étudiée dans la physiopathologie du cancer et surtout dans les pathologies cardiaques et neurodégénératives. En effet, cette voie est susceptible de modifier la morphogénèse cardiaque et le développement du système nerveux (Falls 2003). Des modèles d'animaux transgéniques ont été utilisés pour explorer les rôles joués par la voie NRG1/ErbB dans l'organisme.

### **1.3.1 UN ROLE PRIMORDIAL DANS LA MORPHOGENESE CARDIAQUE**

#### **1.3.1.1 LES RECEPTEURS ERBBs**

La plupart des lignées transgéniques, les KO particulièrement, ont mis en évidence un rôle essentiel de la voie NRG1/ErbB dans la morphogénèse cardiaque (Pentassuglia et Sawyer, 2009). Les embryons formés à partir de ces génotypes meurent pour la plupart *in utero* lors du passage d'une circulation maternelle à leur propre circulation à cause de la perturbation du développement cardiaque.

De nombreuses études portant sur les ErbBs ont montré leur importance dans la formation et le maintien des ventricules cardiaques. Les souris dépourvues d'ErbB2 meurent à mi-gestation du fait d'une malformation des trabécules cardiaques (Lee et al, 1995 ; Erickson et al, 1997). Les souris KO conditionnelles pour ErbB2 au niveau ventriculaire, montrent un décès suite à une cardiomyopathie dilatée d'occurrence postnatale (Crone et al, 2002 ; Ozcelik et al, 2002). Les KO ErbB3 développent une trabéculatation cardiaque normale mais sont incapables de maintenir une bonne fonction cardiaque du fait d'un développement anormal du coussin endocardique (Erickson et al, 1997). Un coussin endocardique fonctionnel est nécessaire à la formation de la valvule auriculo-ventriculaire. Les souris KO pour ErbB3 présentent donc un reflux sanguin conduisant, chez cette espèce, à la mort au jour embryonnaire 13,5. Cette malformation est toutefois moins sévère que les précédentes puisque chez certaines espèces de mammifères les animaux KO pour ErbB3 arrivent à survivre à terme. Les souris déficientes en ErbB1 meurent entre la phase préimplantatoire et 3 semaines post-natales, en fonction du fond génétique, et montrent également un défaut de formation de la valvule aortique (Chen et al, 2000). Toutefois, on observe chez ces animaux des défauts de la prolifération, de la différenciation et de la migration cellulaire dans une très large gamme de tissus.

Aussi, il est difficile de déterminer la cause primaire du décès (Threadgill et al, 1995; Miettinen et al, 1995; Sibilio et al, 1995 ; Miettinen et al, 1999). Le défaut de formation du coussin endocardique est également observable chez des souris KO pour le domaine EGF des isoformes de NRG1 (Meyer et al, 1997) ou pour le récepteur ErbB2 (Lee et al, 1995). De manière semblable aux souris mutantes pour ErbB2, les souris déficientes en ErbB4 meurent à mi-gestation du fait d'un défaut de formation des trabécules cardiaques (Gassman et al, 1995). Les KO conditionnels pour ErbB4 dans le myocarde présentent la même malformation (Garcia-Rivello et al, 2005).

Comme nous l'avons vu précédemment, les récepteurs ErbBs ont de nombreux ligands. Il était donc intéressant de connaître le rôle isolé de la NRG1 dans la morphogénèse cardiaque.

### **1.3.1.2 LA NRG1**

En définitive, la NRG1 s'est révélée d'une importance capitale pour le développement et la fonctionnalité cardiaque.

#### **1.3.1.2.1 RÔLE DU FRAGMENT EGF**

Des altérations majeures du développement cardiaque sont observées dans les pan-*NRG1*<sup>-/-</sup>, dans lequel le domaine EGF commun à tous les isoformes est absent (Meyer et Birchmeier, 1995). Il est important de souligner que, dans la plupart des études, les isoformes  $\beta$  (cf. figure 3) sont 10 à 100 fois plus bioactifs et présentent une affinité plus importante pour les récepteurs ErbB3 et ErbB4 (Ram et al, 1995 ; Cote et al, 2005). En adéquation avec ce constat, les souris KO pour l'isoforme  $\alpha$  sont viables à terme et ne présentent qu'un défaut de développement des glandes mammaires (Li et al, 2002). Ce n'est qu'en cas de gestation que des atteintes cardiaques sont observables chez ce modèle (Lemmens et al, 2011).

La NRG1 présente une structure complexe et un grand nombre d'isoformes (cf. Figure 3). Il n'est donc pas surprenant que ces dernières jouent un rôle d'importance variable.

#### 1.3.1.2.2 UNE VARIABILITE DE FONCTION DEPENDANTE DU TYPE D'ISOFORME

Les souris KO pour le domaine Ig de la NRG1 (cf. Figures 3 et 4) meurent en moyenne au jour embryonnaire 10,5 et présentent un défaut de trabéculatation cardiaque (Kramer et al, 1996). Les animaux hétérozygotes Ig-NRG1<sup>-/+</sup> sont viables et fertiles et ne présentent pas les altérations cardiaques des animaux KO homozygotes pour le même domaine (Kramer et al, 1996). Ce phénotype montre le caractère dominant de l'allèle codant pour le fragment Ig. Une importante malformation cardiaque a également été rapportée chez des souris présentant une mutation ciblée de la queue cytoplasmique de la NRG1 (Liu et al, 1998). Etant donné le rôle de ce fragment souligné précédemment, cette mutation va perturber la translocation à la membrane plasmique de la pro-NRG1. A l'inverse, aucune malformation cardiaque n'a été observée chez les souris dépourvues du domaine riche en cystéine (CRD) de la NRG1 (Wolpowitz et al, 2000), qui est par ailleurs hautement exprimé dans les neurones moteurs. Ce résultat indique que les effets sur le développement cardiaque de la NRG1 sont liés à l'action des isoformes présentant le domaine Ig.

En plus de son rôle dans la morphogénèse cardiaque, la signalétique NRG1/ErbB est également primordiale dans le développement système nerveux central et périphérique.

## **1.3.2 ROLE DANS LE SYTEME NERVEUX CENTRAL ET PERIPHERIQUE**

### **1.3.2.1 LES RECEPTEURS ERBBs**

On observe une neurodégénérescence dans le cortex frontal, les bulbes olfactifs, et le thalamus, après la naissance, chez certaines souris déficientes en ErbB1 (Sibilia et al, 1998 ; Kornblum et al, 2000). Probablement du fait d'une malformation de la crête neurale, les souris déficientes en ErbB2 montrent aussi des altérations fonctionnelles des ganglions sensitifs crâniens (Britsch et al, 1998). De surcroit, il semble qu'ErbB2 joue un rôle dans la différenciation terminale des précurseurs d'oligodendrocytes en oligodendrocytes matures dans la moelle épinière (Park et al, 2001), ainsi que dans la myélinisation des nerfs périphériques par les cellules de Schwann (Morris et al, 1999). Pour explorer ce rôle d'ErbB2 au niveau du système nerveux, il est nécessaire d'éviter la dysfonction cardiaque à l'origine d'un décès précoce de l'animal. Une induction spécifique de l'expression d'ErbB2 dans le myocarde de ces souris transgéniques a donc été réalisée. Cette procédure a permis d'observer, en plus des atteintes centrales, une atteinte majeure de la capacité de migration des cellules de Schwann dans le système nerveux périphérique aboutissant à une perte de neurones sensoriels et moteurs (Woldeyesus et al, 1999). Dans le cas d'ErbB3, les souris KO développent des neuropathies par défaut de myélinisation des nerfs périphériques en raison d'un manque en précurseurs des cellules de Schwann et, par voie de conséquence, de cellules de Schwann matures (Riethmacher et al, 1997). Chez ce modèle, on observe également des défauts de formation du cervelet et des ganglions des nerfs crâniens (Erickson et al, 1997). Les souris mutantes pour ErbB4, contrairement à ce que l'on observe pour la NRG1 ou l'ErbB2, ont également une innervation défectueuse du cerveau postérieur probablement en raison du rôle d'ErbB4 dans le guidage axonal (Gassman et al, 1995).

### 1.3.2.2 LA NRG1

Les souris KO pour le domaine EGF ne présentent pas de phénotypes instructifs sur le plan du système nerveux. Toutefois, ceci est uniquement dû au fait qu'elles meurent à la suite de l'insuffisance cardiaque avant le développement des premières synapses neuromusculaires.

#### 1.3.2.2.1 ROLES DES DIFFERENTS ISOFORMES DANS LES KO SYSTEMIQUES

Malgré une fonction cardiaque normale, les souris KO pour le domaine CRD de la NRG1 présentent un phénotype létal et meurent peu après la naissance d'une insuffisance respiratoire. En effet, l'absence de ce domaine affecte le développement des composants présynaptiques des neurones et des cellules gliales et compromet donc la formation des synapses neuromusculaires. Ces défauts synaptiques ont été décrits globalement comme un phénotype présynaptique qui se caractérise par l'absence de terminaisons nerveuses motrices au niveau des jonctions neuromusculaires (NMJ) et donc par une perte de fonctionnalité notamment respiratoire. Ce phénotype affiche également une réduction marquée du nombre de cellules de Schwann, de la moelle motrice et du nombre de neurones sensoriels par augmentation de leur apoptose. Étonnamment, les souris KO pour le domaine CRD ne montrent pas de réduction du nombre de récepteurs à l'acétylcholine (AChR) dans les synapses. Contrairement aux KO pour le domaine CRD, le phénotype Ig-*NRG1*<sup>-/+</sup> montre une altération de la plaque motrice avec une réduction de 50% du nombre des AChR (Sandrock et al, 1997). Cette observation suggère que les isoformes de NRG1 contenant le domaine Ig sont impliqués dans l'induction de l'expression des AChR.

Des conclusions plus précises ont pu être données de l'étude des KO sur des tissus spécifiques.

#### 1.3.2.2.2 ANIMAUX KO DANS DES TISSUS SPECIFIQUES

Les résultats des KO pour la NRG1 dans le système nerveux (Yang et al, 2001) ressemblaient à ceux trouvés dans les KO systémiques pour le domaine CRD. Cette observation indique l'existence d'un phénotype présynaptique sans impact sur l'expression des AChR dans la jonction neuromusculaire. Ce phénotype présynaptique est également observé chez des souris KO pour ErbB2 une fois qu'une expression cardiaque de cette même protéine a été induite pour préserver

l'organe (Woldeyesus et al, 1999). Malgré le phénotype présynaptique sévère, la transcription des AChR n'a été que modérément touchée chez ce modèle. Ceci remet en cause l'idée que la NRG1 est un régulateur indispensable à la transcription des AChR dans les synapses. En effet, les KO ErbB2 au niveau du muscle squelettique montrent une modeste réduction de 20% dans l'expression des AChR dans la NMJ (Leu et al, 2003) et les KO ErbB4 (avec induction cardiaque) ne montrent quant à eux aucune anomalie dans le développement neuromusculaire (Tidcombe et al, 2003). De même, les KO ErbB2 et ErbB4 au niveau du muscle squelettique affichent une réduction de seulement 10% de la densité des AChR et une réduction de 30% de leur ARNm présents au niveau synaptique. Bien que la NRG1 active l'expression des AChR (Altiok et al, 1995, Falls et al, 1993), d'autres facteurs, comme l'agrine, agissent donc en synergie avec cette dernière. Ces facteurs contribuent probablement de manière prépondérante au maintien de la NMJ à l'état différenciée (Ngo et al, 2012; Escher et al, 2005).

Au travers de l'ensemble de ces données, on voit se dessiner des modes d'actions paracrine ou juxtacrine de la NRG1 dépendants du tissu. Au niveau musculaire, l'effet de la NRG1 est médié par une isoforme portant le domaine Ig et un domaine EGF de type  $\beta$ . Dans le système nerveux, c'est la NRG1 portant le fragment CRD qui est primordiale. Synthétiquement, il semble que le muscle (cardiaque et squelettique) reçoit le signal NRG1 en provenance des cellules adjacentes (paracrine). A l'inverse, le neurone produit la NRG1 pour modeler son environnement immédiat (juxtacrine).

## 1.4 IMPLICATIONS PHYSIOPATHOLOGIQUES DE LA VOIE NRG1/ERBB

Le champ des pathologies cardiovasculaires sera abordé dans un second temps dans le manuscrit. Il n'y sera pas fait référence dans cette partie. Les pathologies du système nerveux central et les cancers sont des thématiques de recherche extrêmement prolifiques en ce qui concerne la voie NRG1/ErbB. L'objectif de cette revue de littérature très succincte ne sera donc pas exhaustive mais permettra au lecteur une vue d'ensemble des principales implications physiopathologiques de la voie NRG1/ErbB.

### 1.4.1 NRG1/ERBB ET PATHOLOGIES DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL

Au niveau du système nerveux central, la NRG1 a été largement étudiée sur les maladies du cortex cérébral que sont la Schizophrénie et la maladie d'Alzheimer (MA) (Revue : Mei et Nave, 2014 ; Fleck et al, 2012). Il semble que, du point de vue des fonctions cognitives, l'activation de la voie NRG1/ErbB suive une courbe en U inversé. L'adage « ni trop, ni trop peu » pourrait donc assez bien décrire la physiologie de cette voie dans le système nerveux central.

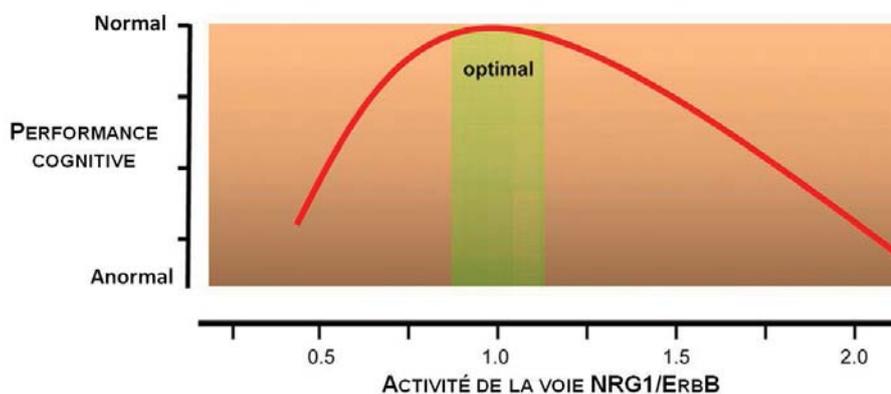


FIGURE 9: SCHEMA DE L'INFLUENCE DE L'ACTIVITE DE LA VOIE NRG1/ERBB SUR LES FONCTIONS COGNITIVES.

(D'après Mei et Nave, 2014)

L'étude de la voie NRG1/ErbB dans le système nerveux central a conduit un certain nombre d'auteurs à modéliser les effets de la NRG1 selon une trajectoire parabolique. Les performances cognitives semblent tout autant altérées par une hyperactivité de la voie que par son inhibition. Cependant, on retrouve des symptômes différents suivant le profil d'hypo ou hyperactivité de la voie NRG1/ErbB.

#### **1.4.1.1 LA SCHIZOPHRENIE**

La NRG1 et sa signalétique cellulaire portent de nombreux espoirs pour le traitement et la compréhension biologique de la schizophrénie.

Les études épidémiologiques montrent une association entre les polymorphismes du gène NRG1 et la prévalence de la schizophrénie dans certains groupes de populations (Li et al, 2006; Munafo et al, 2006). Les premiers indices étayant cette observation ont été donnés par l'étude post-mortem de cerveaux humains. En effet, il a été montré une augmentation de la signalisation ErbB4 induite par la NRG1 chez les patients schizophrènes. Ce phénomène a été vu dans le cortex préfrontal et semble associé à une diminution de l'activité du récepteur NMDA participant ainsi à la pathogenèse de la schizophrénie (Hahn et al, 2006).

De plus, les modèles animaux de souris dépourvues de NRG1, ErbB2, ErbB3 ou ErbB4 dans le système nerveux central présentent différents déficits comportementaux parmi lesquels l'hyperactivité, la réduction du conditionnement par la peur, l'inhibition latente, la réduction de la mémoire de travail ou encore un comportement social anormal (Boucher et al, 2007; Chen et al, 2008; Duffy et al, 2008; Ehrlichman et al, 2009; Gerlai et al, 2000; Karl et al, 2007; Moy et al., 2009; O'Tuathaigh et al, 2006 ; Rimer et al, 2005 ; Stefansson et al, 2002). De même, les animaux déficitaires en métalloprotéases comme BACE1 ou la Neuropsine (capable de cliver la NRG1) ont montré des déficits comportementaux caractéristiques (Savonenko et al, 2008 ; Tamura et al, 2012). D'un autre côté, des souris transgéniques surexprimant la NRG1 développent également un grand nombre d'altérations comportementales (Deakin et al, 2009 ; Deakin et al, 2012; Kato et al, 2010; Luo et al, 2013 ; Yin et al, 2013a). De plus, le blocage de l'expression de la NRG1 dans les neurones pyramidaux de souris adultes diminue ces troubles comportementaux et la dysfonction synaptique (Luo et al, 2014 ; Yin et al, 2013).

#### **1.4.1.2 LA MALADIE D'ALZHEIMER**

Les polymorphismes du gène NRG1 humain sont associés à des caractéristiques psychotiques dans certaines formes familiales de maladie d'Alzheimer à début tardif (Go et al, 2005). Toutefois, l'essentiel des connaissances existantes sur la NRG1 concerne la plasticité neuronale et la relation entre MA et NRG1 reste encore largement à explorer.

Deux aspects majeurs sont à mettre en exergue à la lumière de la contribution physiologique de la NRG1 dans la maladie d'Alzheimer (MA).

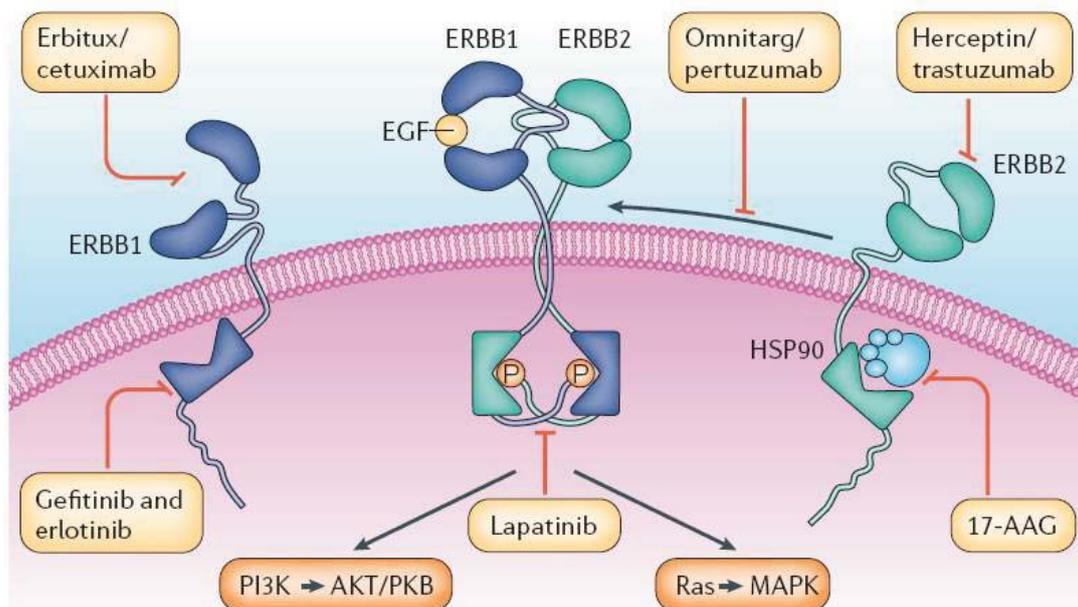
En premier lieu, une régulation à la hausse et de la NRG1 et de l'enzyme de clivage  $\beta$ -amyloïde 1 (BACE1) est associée à la formation des plaques amyloïdes dans des modèles de souris transgéniques de la MA ainsi que dans les cerveaux de patients (Zhao et al, 2007). Ce phénomène est très probablement dû à la dystrophie neuronale autour des plaques (Zhang et al, 2009). Par ailleurs, il a été observé une colocalisation de la NRG1 et de son récepteur ErbB4 dans les tissus affectés (Chaudhury et al, 2003). Cependant, ces analyses ont été effectuées post-mortem ce qui ne permet pas de juger de la fonctionnalité du récepteur ErbB4 et de l'activité cellulaire effective qui en découle.

Deuxièmement, compte tenu des observations précédentes, des inhibiteurs de l'activité de BACE1 ont été testés comme traitement de la MA. Ces essais ont montré qu'une modulation inadaptée des processus protéolytiques de la NRG1 par BACE1 peut aboutir à des effets indésirables (Sankaranarayanan et al, 2009). En définitive, le blocage total de l'activité de BACE1 ne semble pas l'objectif à rechercher mais plutôt une normalisation de ses niveaux d'expression.

La MA est une pathologie communément associée à l'avancée en âge ce qui renforce le lien possible entre la voie de la NRG1 et le vieillissement. La MA n'est toutefois pas la seule pathologie dont la prévalence est accrue chez les personnes âgées. En effet, il est de notoriété publique que la probabilité d'apparition d'un cancer est augmentée avec l'âge. Or, ce groupe de pathologies constitue l'un des pôles de recherche les plus dynamiques en ce qui concerne la NRG1 et ses récepteurs.

### 1.4.2 NRG1/ERBB ET CANCERS

La relation entre la voie NRG1/ErbB et le cancer a été extensivement étudiée (revues sur le thème : Montero et al, 2008 ; Breuleux 2007). La surexpression des récepteurs ErbBs est un trait commun observable dans un large éventail de tumeurs et représente une stratégie des tumeurs malignes pour activer les voies en aval de ces récepteurs (Wali et al, 2014 ; Berghoff et al, 2013 ; Emre et al, 2013 ; Kraus et al, 1989). Ce faisant, les ErbBs favorisent ainsi la prolifération des cellules cancéreuses, leur survie, leur invasion de nouveaux tissus et la production de métastases. A titre d'exemple, l'amplification du gène ErbB2 est observée dans 20 à 30% des cancers du sein et est associée à une diminution de la survie ainsi qu'à une augmentation du taux de rechute (Slamon et al, 1987). Ces éléments ont conduit au développement de nombreuses stratégies visant à cibler la signalétique cellulaire dépendante des ErbBs (Figure 9).



**FIGURE 10: EXEMPLE DE DIFFERENTS TRAITEMENTS CIBLANT LA SIGNALÉTIQUE DES ERBBs**

(D'après Citri et Yarden 2006)

Anticorps monoclonaux : TRASTUZUMAB (Herceptin; Genentech); CETUXIMAB (Erbix; Bristol Myers Squibb /ImClone) ; OMNITARG/PERTUZUMAB (Encours d'évaluation). Inhibiteurs de l'activité tyrosine-kinase : GEFITINIB (Iressa; Astra Zeneca) ; ERLOTINIB (Tarceva ; Genentech/OSI), LAPATINIB (GlaxoSmithKline). Inhibiteurs de l'HSP90 : 17-N-allylamino-17-demethoxygeldanamycine (17-AAG) (En cours d'évaluation).

En plus du ciblage des ErbBs, des preuves indiquent que les ligands NRG1-4, indépendamment des récepteurs, jouent aussi un rôle dans le développement et/ou la progression de certains types de cancer humain (Han et al, 2015). Comme nous l'avons vu précédemment, les études *in vitro* indiquent que les NRG1-4 agissent comme de puissants facteurs mitogéniques dans les cellules qui expriment leurs récepteurs (Holmes et al, 1992, Aguilar et al, 1999).

Des études *in vivo* chez la souris ont montré que la surexpression des NRG1-4 dans des tissus mammaires a pour résultats l'apparition d'adénocarcinomes (Aguilar et al, 1999), et favorise la propagation métastatique des cellules cancéreuses du sein *in vivo* (Atlas et al, 2003). De plus, la réduction de l'expression des NRG1-4 par l'utilisation de brin d'ADN antisens réduit le potentiel tumoral et la formation de métastases de cellules de cancer du sein (Tsai et al, 2003).

Dans le cadre du cancer, il est difficile de différencier l'origine de la conséquence, quoiqu'il en soit la voie NRG1/ErbB joue un rôle majeur dans la physiopathologie de ces maladies. Cette voie de signalisation démontre donc clairement une implication primordiale dans certaines pathologies couramment observées chez la personne âgée.

En marge de ce constat et pour illustrer l'étendue des rôles physiologiques de cette voie, il est intéressant de mentionner d'autres cas plus originaux.

### 1.4.3 AUTRES IMPLICATIONS PATHOLOGIQUES

Les phénotypes des souris déficientes en ErbBs montrent les rôles importants que jouent ces récepteurs dans de nombreux tissus et permettent de comprendre les origines de certaines dysfonctions menant à différentes pathologies telles que le psoriasis ou la lèpre.

Le psoriasis, par exemple, pourrait être dû à une dérégulation de l'activation du récepteur ErbB1. Du moins, c'est ce que suggère sa surexpression dans l'épiderme des lésions psoriasiques. De plus, l'épiderme aminci des souris dépourvues de cette protéine et les lésions psoriasiformes induites par l'absence de son inhibiteur LRIG-1 étayent cette hypothèse (Suzuki et al, 2002 ; King et al, 1990).

Le bacille de la lèpre, *Mycobacterium Leprae*, peut se lier directement à ErbB2 pour l'activer indépendamment de toute dimérisation avec d'autres récepteurs ErbBs. L'activation du récepteur conduit alors à une démyélinisation des nerfs et serait responsable des neuropathies périphériques caractéristiques de cette pathologie (Tapinos et al, 2006).

Cette liste est bien entendu non exhaustive mais montre le caractère ubiquitaire des rôles joués par les ErbBs chez les mammifères. De même, les atteintes observées dans le vieillissement sont elles aussi nombreuses et systémiques. La quasi absence de données reliant la NRG1 et le vieillissement semble donc un champ d'investigation prometteur.

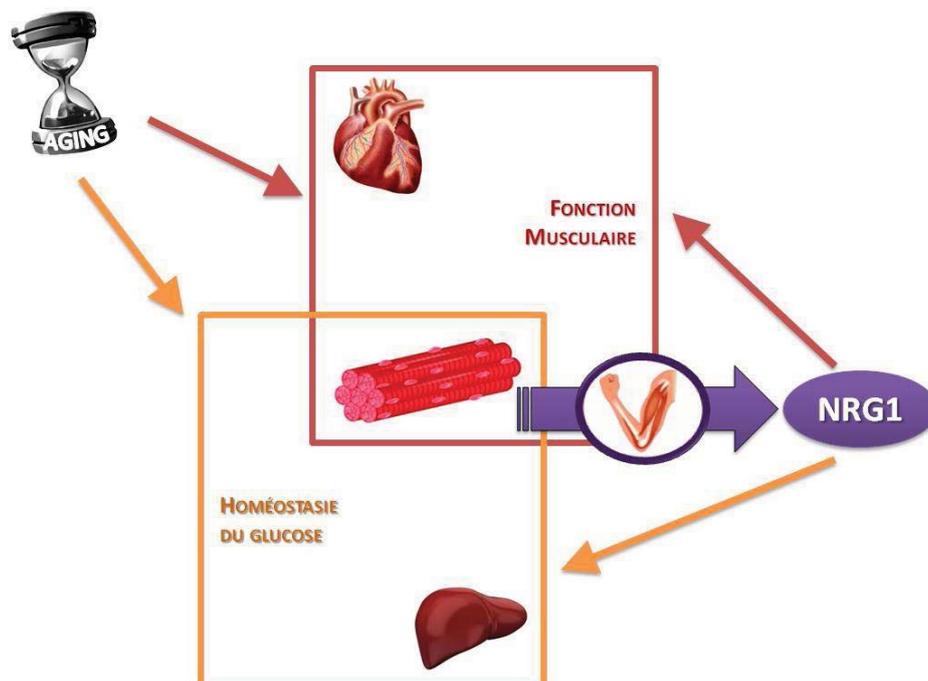
## 2 VOIE NRG1/ERBB ET VIEILLISSEMENT

La NRG1 et ses récepteurs, les ErbBs, possèdent de très nombreux rôles physiologiques durant le développement et l'Age adulte dont certaines restent encore certainement à découvrir. Dans la perspective de visualiser cette voie au sein d'un continuum physiologique, les données sur le vieillissement sont, à l'heure actuelle, quasi-inexistantes. L'objet de ce travail de recherche était donc de s'intéresser à l'impact du vieillissement sur la voie de la NRG1 dans des tissus dont la préservation est primordiale pour un vieillissement réussi.

La perturbation de l'homéostasie du glucose, les maladies cardiovasculaires et la sarcopénie sont des phénomènes systémiques et interdépendants liés à l'âge. Comme nous allons le voir, la littérature scientifique établit un lien, plus ou moins robuste, entre la NRG1 et chacune des grandes fonctions liées à ces pathologies.

Dans l'hypothèse où la NRG1 serait libérée durant la contraction musculaire, nous nous sommes alors posé la question de son impact systémique.

Il sera donc présenté, dans les parties suivantes, le parallèle entre atteintes liées au vieillissement et rôle de la NRG1. Ce recoupement entre NRG1 et âge sera développé dans trois champs que sont l'homéostasie glucidique, la fonction musculaire squelettique et la fonction cardiaque.



## 2.1 NRG1, VIEILLISSEMENT ET METABOLISME GLUCIDIQUE

Le vieillissement est un des états physiologiques couramment associé à une dépréciation de l'homéostasie du glucose (Paolisso et al, 1995). Or, en sus de son potentiel myogénique, de ses propriétés neurotrophiques ou de son rôle carcinogène, il a récemment été suggéré que la NRG1 pourrait également influencer sur le métabolisme du glucose (Guma et al, 2010). Ce nouveau rôle physiologique a été exploré au niveau du muscle squelettique (Suarez et al, 2001 ; Canto et al, 2007), principalement responsable de la captation glucose induite par l'insuline, et dans le foie (Carver et al, 1996 ; Carver et al, 1997), régulateur majeur de l'homéostasie glycémique. Fait intéressant, les propriétés de la NRG1 dans ces deux tissus semblaient opposées du point de vue de leurs effets à l'échelle systémique. En effet, il a été respectivement mis en exergue un impact positif et négatif sur les insulino-sensibilité musculaire et hépatique.

Compte tenu de ces éléments, la voie de signalisation NRG1/ErbB pourrait donc être impliquée dans les déficiences métaboliques liées à l'âge. Il sera donc mis en lumière dans les paragraphes suivants les données scientifiques convergentes entre perturbations du métabolisme glucidiques liées à l'âge et les rôles physiologiques de la voie NRG1/ErbB.

## **2.1.1 VIEILLISSEMENT ET METABOLISME GLUCIDIQUE**

Chez les mammifères, le métabolisme du glucose est régi par un ensemble complexe de signaux qui affectent finalement l'absorption ainsi que l'utilisation de glucose par les tissus périphériques, la production de glucose par le foie et la libération d'insuline par le pancréas. Le processus de vieillissement étant associé à des altérations fonctionnelles dans la plupart des paramètres physiologiques mesurables (Finch 1994), un des phénomènes les plus couramment rencontré est un déficit dans la capacité à réguler efficacement le métabolisme du glucose.

### **2.1.1.1 CONTEXTE**

Des niveaux élevés de glucose à jeun, une intolérance au glucose ou encore une résistance à l'insuline sont autant de perturbations dont la prévalence augmente dans la population âgée (De Fronzo 1979; De Fronzo 1981; Kohrt et al, 1993; Fink et al, 1983). Conséquence de cela, l'une des maladies les plus courantes chez les personnes âgées est le diabète de type 2. A titre d'exemple, l'étude ENTRED qui a consisté en une analyse de l'ensemble des remboursements de soins du régime général d'assurance maladie (échantillon de population de 2007 extrapolé à la France entière en 2008), a déterminé une prévalence du diabète de 3,95 %, soit 2,5 millions de patients traités. L'âge moyen des patients traités était de 64,8 ans (écart-type : 13,8 ans) illustrant ainsi la part importante pris par le vieillissement dans l'étiologie de la maladie. Dans une étude longitudinale de plus de 4500 personnes en bonne santé, Lindstrom et Tuomilehto ont montré que la probabilité de patients âgés de 55 à 64 ans de développer un diabète de type 2 nécessitant un traitement est pratiquement équivalente à celle des patients présentant un IMC supérieur à 30 (Lindström et Tuomilehto, 2003). Pris séparément, l'obésité clinique et l'âge avancé présentent donc un risque semblable de dysfonction du métabolisme du glucose.

Les études sur l'intolérance au glucose liée à l'âge peuvent être difficiles à interpréter du fait que le développement de cette pathologie dépend d'une combinaison de nombreux facteurs (De Tata et al, 2014). Il est compliqué de définir l'influence de chacun indépendamment des autres et ainsi leur importance respective reste sujette à débat.

Toutefois, la physiopathologie de l'intolérance au glucose est centrée autour de la fonctionnalité de l'insuline. D'une part, on observe une résistance cellulaire à son

action dans un grand nombre de tissus. D'autre part, plusieurs observations montrent clairement que la résistance à l'insuline seule ne suffit pas pour conduire au diabète de type 2, un défaut de fonctionnement des cellules bêta pancréatiques avec sécrétion anormale de cette hormone étant nécessaire (De Tata et al, 2014).

### **2.1.1.2 L'INSULINO-RESISTANCE**

La perturbation de la réponse à l'insuline dans les tissus périphériques est appelée insulino-résistance. Sur le plan clinique, ce terme est utilisé pour indiquer des niveaux circulants d'insuline accrus pour le maintien d'une glycémie standard ce qui correspond, au niveau cellulaire, à une moindre capacité à activer son récepteur (IR) et les cascades de signalisation en aval de ce dernier. La technique de clamp euglycémique hyperinsulinémique (GOLD standard) a été utilisée pour attester de ce phénomène et de son importance dans l'intolérance au glucose liée à l'âge (De Fronzo 1981, Fink et al, 1983, Rowe et al, 1983) mais d'autres méthodes indirectes existent (HOMA, QUICKI). L'insulino-résistance des principaux tissus répondeurs tel que le muscle squelettique, le tissu adipeux blanc ou encore le foie est généralement considérée comme l'étiologie primaire du dysfonctionnement du métabolisme du glucose. Chacun de ces tissus présente par ailleurs cette altération avec l'âge (De Fronzo 1979; De Fronzo 1981; Rowe et al, 1983).

#### **2.1.1.2.1 ALTERATION DE LA SIGNALÉTIQUE DE L'INSULINE AVEC L'ÂGE**

L'action de l'insuline, initiée par la liaison à son récepteur transmembranaire, comporte une cascade de signalisation provoquant la captation de glucose (tissu adipeux et muscle), une inhibition de la néoglucogenèse (foie) ainsi qu'une activité de modulation transcriptionnelle. Cette cascade débute par l'autophosphorylation du récepteur et l'initiation de son activité tyrosine kinase intracellulaire permettant la phosphorylation en tyrosine de l'IRS1 ou 2 (substrat du récepteur à l'insuline). La phosphorylation du récepteur permet l'activation de la PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) qui induit l'activation d'Akt. Dans le cadre de ce travail de recherche, nous nous intéresserons plus particulièrement à l'effet de l'insuline dans le foie et le muscle.

Dans la cellule musculaire, l'activation d'Akt et de son médiateur en aval, AS160, stimule la translocation des GLUT4 vers la membrane plasmique (Sano et al, 2003; Watson et Pessin, 2006). Les études portant sur le vieillissement révèlent une

réduction de la captation du glucose insulindépendante concomitante d'une réduction de la translocation du transporteur GLUT4 vers la membrane sarcolemmale. Cette baisse est expliquée par une altération de l'ensemble de la cascade de signalisation depuis l'IRS1 (substrat du récepteur à l'insuline) jusqu'à la GSK3 (glycogène synthase kinase-3) en passant par des médiateurs comme AKT (protéine kinase B) (Gardner et al, 2003 ; Maechler et al, 1999 ; Dokken et al, 2008 ; Maddux et al, 2001 ; Singh et al, 2008).

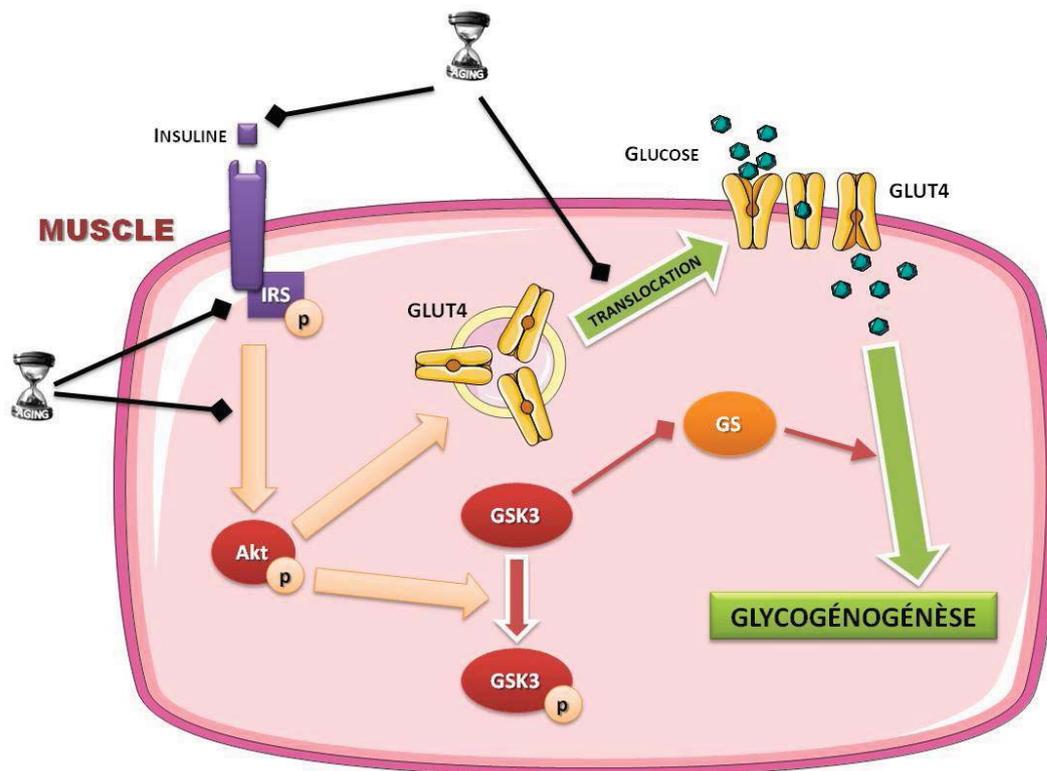


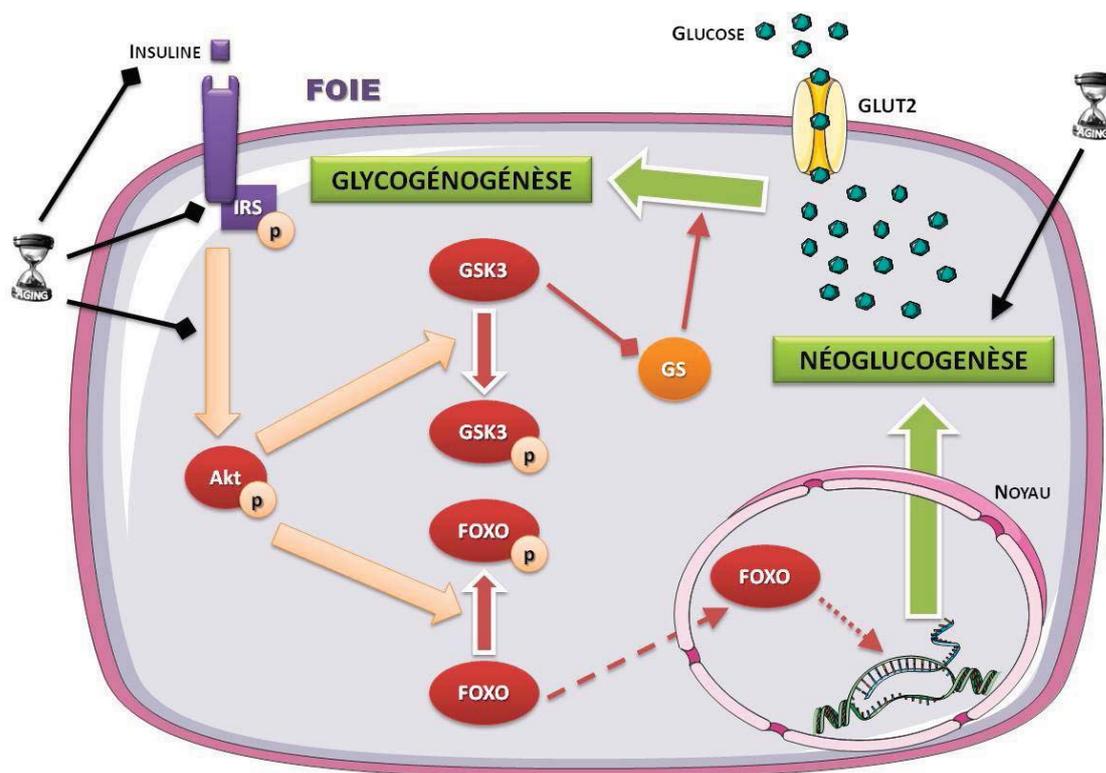
FIGURE 11: SIGNALETIQUE MUSCULAIRE DE L'INSULINE ET IMPACT DU VIEILLISSEMENT

L'insuline en se fixant à son récepteur (IR) active sa voie de signalisation intracellulaire et notamment AKT qui va ensuite induire, d'une part, la translocation des GLUT4 à la membrane sarcolemmale, et d'autre part, la levée de l'inhibition du glycogène synthétase (GS) via la phosphorylation du glycogène synthétase kinase 3 (GSK3). Ces signaux cellulaires vont stimuler la captation de glucose au niveau musculaire et la synthèse de glycogène. Le vieillissement (Sablier) ou les facteurs délétères qui y sont associés perturbent ces mécanismes induits par l'insuline. Les traits terminés par des flèches représentent une stimulation. Les traits terminés par un losange une inhibition.

L'insuline agit également sur le foie pour réguler la production hépatique de glucose (HGP) qui joue un rôle majeur dans l'homéostasie du glucose à jeun et en postprandial chez l'individu sain (Felig et Wahrner, 1971). La principale différence entre les deux tissus réside dans le fait que le glucose pénètre spontanément dans l'hépatocyte, via le transporteur GLUT2, en fonction du gradient de concentration plasmatique. L'activation d'Akt agit alors comme inhibiteur de la néoglucogénèse et

stimulateur de la synthèse de glycogène par le bais de FOXO et GSK3, respectivement (Savage et al, 2007).

Or, la production basale hépatique de glucose ne semble pas affectée par le vieillissement chez le sujet âgé non diabétique (Barzilai et al, 1998). Cependant, la suppression de la HGP par une charge orale de glucose ou par l'insuline est diminuée avec le vieillissement (Jackson et al, 1988). La baisse de sensibilité hépatique à l'insuline avec l'âge a été suggérée depuis longtemps (Freeman et al, 1973) mais de plus en plus d'éléments semblent indiquer un rôle des facteurs associés au vieillissement plutôt que de l'âge *per se* (Gupta et al, 2000). A titre d'exemple, l'accumulation de tissu adipeux viscéral est régulièrement pointé du doigt (Gupta et al, 2000; Hirose et al, 2015) et l'hyperactivité  $\beta$ -adrénergique semble également jouer un rôle (Muscogiuri et al, 2011).



**FIGURE 12: SIGNALÉTIQUE HÉPATIQUE DE L'INSULINE ET IMPACT DU VIEILLISSEMENT**

L'insuline en se fixant à son récepteur (IR) active sa voie de signalisation intracellulaire et notamment AKT. D'une part, cette activation va induire la phosphorylation de FOXO ou *Forkhead box Protein O1*, l'empêchant ainsi de pénétrer dans le noyau et d'exercer son activité transcriptionnelle. D'autre part, ceci va lever l'inhibition du glycogène synthétase (GS) via la phosphorylation du glycogène synthétase kinase 3 (GSK3). Ces signaux cellulaires vont stimuler la synthèse de glycogène et inhiber la néoglucogenèse. Le vieillissement (sablier) ou les facteurs délétères qui y sont associés perturbe ces mécanismes induits par l'insuline. Les traits terminés par des flèches représentent une stimulation. Les traits terminés par un losange une inhibition.

#### 2.1.1.2.2 ETIOPATHOGENIE DE L'INSULINO-RESISTANCE AVEC L'AGE

Le vieillissement *per se* semble un facteur indépendant à l'origine de la baisse de la réponse à l'insuline (Karakelides et al, 2010; Jackson et al, 1988; Gabriely et al, 2002) bien que la question reste encore très controversée (Goulet et al, 2009; Soriguer et al, 2014). Quoiqu'il en soit, il est largement admis que l'âge n'est pas l'unique facteur de perturbations physiopathologiques. Ce processus entre en interaction avec le patrimoine génétique et des facteurs physiologiques ou environnementaux (De Tata et al, 2014).

##### **2.1.1.2.2.1 Facteurs de modulation de l'insulino-résistance liée à l'âge**

La sensibilité à l'insuline peut être influencée indirectement par des changements liés à l'âge. On peut citer les variations de la composition corporelle comme l'augmentation de l'adiposité abdominale (Khort et al, 1993) ou la sarcopénie (Srikanthan et al, 2010). Des facteurs circulants sont aussi impliqués, comme des taux anormaux de certaines hormones (cortisol, testostérone) auxquels s'ajoutent l'élévation des taux plasmatiques de peptides inflammatoires (Maggio et al, 2007; Rudin et Barzilai, 2005; Yokoyama et al, 2015).

Le comportement individuel, en particulier par le biais de l'activité physique et de la nutrition, peut fortement influencer le tableau clinique et l'ensemble de ces facteurs délétères (Ruiz-Nunez et al, 2013 ; Bunprajun et al, 2013).

Par ailleurs, la restriction énergétique et l'entraînement semblent agir sur des éléments cellulaires communs tels que les dysfonctionnements mitochondriaux. Ces derniers, ainsi que le stress oxydatif qui y est associé, sont des éléments fréquemment rapportés durant le vieillissement (Petersen et al, 2003 ; Toledo et al, 2013 ; Phielix et al, 2011 ; Dela et al, 2013 ; Bertrand et al, 2013). Comme nous le verrons plus loin dans ce manuscrit, certains travaux publiés ont montré une influence potentielle de la neuréguline sur le métabolisme mitochondrial. Dans la partie suivante, nous allons donc développer de manière plus approfondie l'impact du vieillissement sur le fonctionnement de la mitochondrie. Nous verrons également les répercussions potentielles dans la régulation de l'insulino-sensibilité qui seront des déterminants majeurs dans le fondement du rationnel de nos travaux.

### 2.1.1.2.2 Dysfonction mitochondriale liée à l'âge

Le dysfonctionnement mitochondrial est un des éléments cellulaires clés du développement de l'insulino-résistance (Szendroedi et al, 2012), y compris dans le cadre du vieillissement (Petersen et al, 2003). Des régulateurs importants de la biogénèse mitochondriale comme PGC1 $\alpha$  et PGC1 $\beta$  voient leur expression diminuer avec l'âge (Ling et al, 2004) et cette diminution entraîne une baisse du contenu mitochondrial (Figure 13).

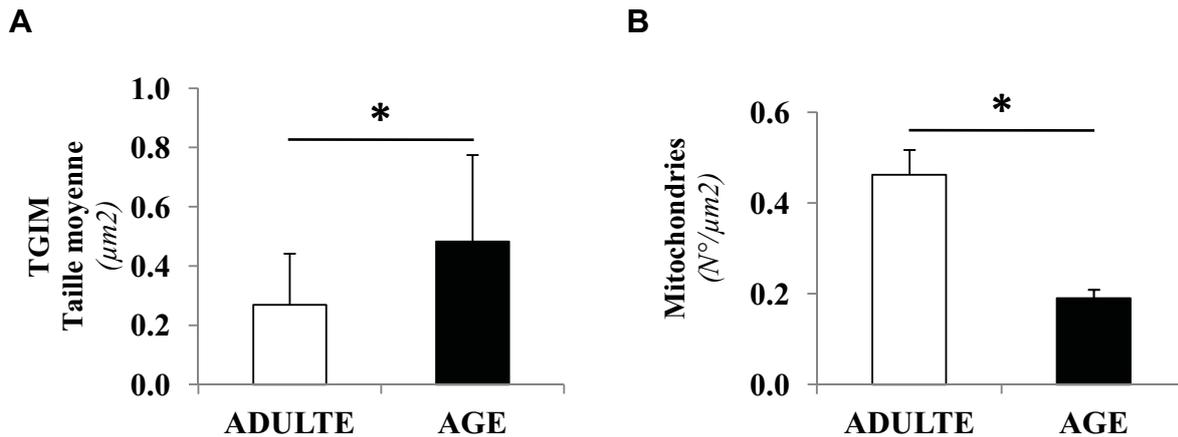


FIGURE 13: EFFET DE L'AGE SUR LES MITOCHONDRIES ET LES LIPIDES INTRAMUSCULAIRES CHEZ L'HUMAIN.

(D'après Crane et al, 2010)

Les auteurs ont utilisés un microscope électronique pour effectuer la quantification (A) (IMCL) de la taille des lipides intramyocellulaires et (B) du nombre de mitochondries chez des participants adultes ( $23 \pm 2$  ans) et les âgés ( $71 \pm 2$  ans). Les valeurs sont la moyenne  $\pm$  SE. \*  $p < 0,05$ .

Ces protéines régulent également la thermogénèse adaptative ou l'oxydation des substrats dont la localisation est mitochondriale. La résultante de cette diminution d'expression est donc une baisse du niveau d'utilisation des acides gras (Iossa et al, 2004 ; Ling et al, 2004). Ainsi, la perte de fonctionnalité mitochondriale participe au phénomène de lipotoxicité intracellulaire (Figure 13) observé avec l'âge dans le muscle squelettique (Crane et al, 2010). D'autres phénomènes observés avec l'âge peuvent induire une lipotoxicité dans le muscle ou le foie. L'accumulation de graisse viscérale, où la résistance à l'insuline des adipocytes, peuvent également être à l'origine de ce phénomène chez la personne âgée (Slawik et Vidal-Puig, 2006). De plus, la lipotoxicité peut induire une production accrue d'espèces réactives de l'oxygène, un mécanisme responsable d'une réduction de la réponse intracellulaire à l'insuline (Gardner et al, 2003 ; Dokken et al, 2008).

Parallèlement à l'ensemble de ces observations, certaines études montrent clairement que la résistance à l'insuline seule ne suffit pas pour conduire à une intolérance au glucose.

### **2.1.1.3 BAISSSE DE LA SECRETION D'INSULINE AVEC L'AGE**

Le dysfonctionnement des cellules bêta est de plus en plus reconnu pour jouer un rôle important dans la physiopathologie de l'intolérance au glucose et pourrait représenter l'autre facteur contribuant au métabolisme anormal du glucose avec l'âge (De Tata et al, 2014). En effet, il a été rapporté à plusieurs reprises que la capacité de la cellule  $\beta$  pancréatique à maintenir une fonction de sécrétion d'insuline suffisante est altérée avec l'âge. Ceci a été observé sur modèle animal (Bergamini et al, 1991 ; Novelli et al, 1999) et chez des patients (Iozzo et al, 1999 ; Oya et al, 2014).

#### **2.1.1.3.1 MECANISMES A L'ORIGINE DE L'INSUFFISANCE B-SECRETOIRE**

L'insuffisance sécrétoire des cellules  $\beta$  pancréatique peut être due à deux phénomènes : une dysfonction cellulaire du processus de sécrétion ou un pool de cellules insuffisant pour répondre à la demande métabolique.

##### **2.1.1.3.1.1 Dysfonction cellulaire**

L'exocytose d'insuline est un processus en cascade impliquant notamment la pénétration pancréatique de glucose via les GLUT2, la production d'ATP par la mitochondrie (ou via la glycolyse) et un influx calcique permettant l'action des kinésines transportant les granules (Eliasson et al, 2008). Or, il a été observé lors du vieillissement une réduction des niveaux de GLUT2 (Ihm et al, 2007, Novelli et al, 2000), une dysfonction mitochondriale (Cree et al, 2008 ; Supale et al, 2013) et une déficience de la recapture du  $Ca^{2+}$  dans les cellules  $\beta$  (Li et al, 2014). On observe donc une atteinte à différents niveaux parmi lesquels la dysfonction mitochondriale mérite une attention particulière. En effet, les mitochondries jouent un rôle crucial dans le couplage entre la présence du glucose au niveau cellulaire et l'exocytose à proprement dite. Ces organelles agissent comme capteurs des éléments nutritifs et des générateurs de signal, énergétique en l'occurrence, pour la sécrétion d'insuline (Supale et al, 2012).

L'origine des dysfonctionnements cellulaires reste difficile à définir tant le vieillissement cellulaire reste un phénomène extrêmement complexe dont les tenants

et les aboutissants échappent, pour la plupart, à notre compréhension. De plus, ces atteintes de la fonctionnalité cellulaire semblent accompagnées d'une perturbation des capacités de prolifération des cellules  $\beta$ .

#### **2.1.1.3.1.2 Sénescence des cellules $\beta$ pancréatique**

Les cellules  $\beta$  présentent habituellement une prolifération lente chez l'humain adulte. Toutefois, elles semblent capables de s'adapter aux stimuli environnementaux comme le suggère l'augmentation de la masse pancréatique (30-40%) chez certains patients obèses (Kloppel et al, 1985 ; Rahier et al, 2008). Dans le cas du vieillissement, la sénescence répliquative pourrait être à l'origine d'un déficit adaptatif (Park et al, 2004). En effet, une carence en télomérase et une réduction de la longueur des télomères ont été décrits dans les cellules béta-pancréatique de souris âgées (Kuhlow et al, 2010; Guo et al, 2011). Cette carence impacte directement la capacité répliquative des cellules  $\beta$  et donc, potentiellement, leur capacité à se renouveler ou à proliférer (Gianani et al, 2011). Chez l'humain, dont les télomères sont plus courts que chez la souris, le même mécanisme a été observé chez des patients de plus de 60 ans atteints de diabète de type 2, la longueur des télomères était alors inversement corrélée au taux d'HbA1C (Tamura et al, 2014). Fait intéressant, l'utilisation d'un traitement hypoglycémiant par les patients semble aggraver le phénomène.

***Le processus de vieillissement et/ou les divers changements physiologiques qui y sont associés vont donc négativement impacter la capacité de régulation du métabolisme du glucose. Bien qu'un grand nombre de facteurs entre en jeu, la fonctionnalité de l'insuline est le mécanisme central de cette perturbation. Or, il a été montré que la NRG1 et l'insuline interagissent l'une avec l'autre dans les tissus musculaires et hépatiques.***

## 2.1.2 NRG1 ET METABOLISME GLUCIDIQUE

La question du rôle de la NRG1 comme régulateur du métabolisme a été initiée au début des années 2000 par des études réalisées sur le tissu musculaire squelettique. Les auteurs ont conclu à un effet positif de la NRG1 sur le métabolisme du glucose au niveau musculaire. Toutefois, quelques études sur le tissu hépatique ont également été conduites et leurs conclusions ne sont pas nécessairement convergentes avec les résultats sur tissu musculaire. Enfin, certaines données tendent à montrer une implication de la NRG1 dans le phénomène d'insulino-résistance au niveau systémique.

### 2.1.2.1 NRG1 ET METABOLISME ENERGETIQUE MUSCULAIRE

L'effet de la NRG1 sur le métabolisme musculaire a été étudié soit de manière directe, soit dans un contexte fonctionnel via la contraction musculaire.

#### 2.1.2.1.1 EFFET DIRECT SUR LA CELLULE MUSCULAIRE

Suarez et al. ont indiqué que, dans le muscle squelettique, en plus de ses rôles myogéniques et neurotrophiques bien connus, la NRG1 pouvait induire une captation du glucose de manière aiguë et chronique (Figure 11 ; Suarez et al, 2001).

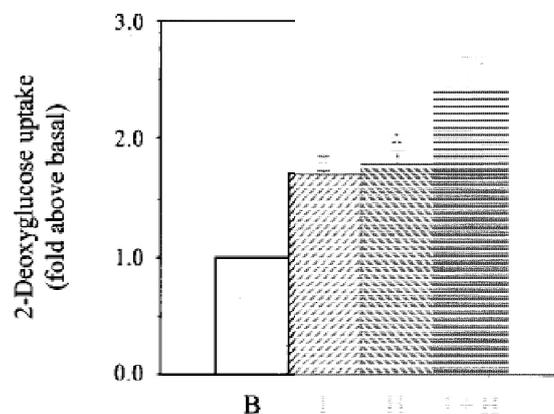
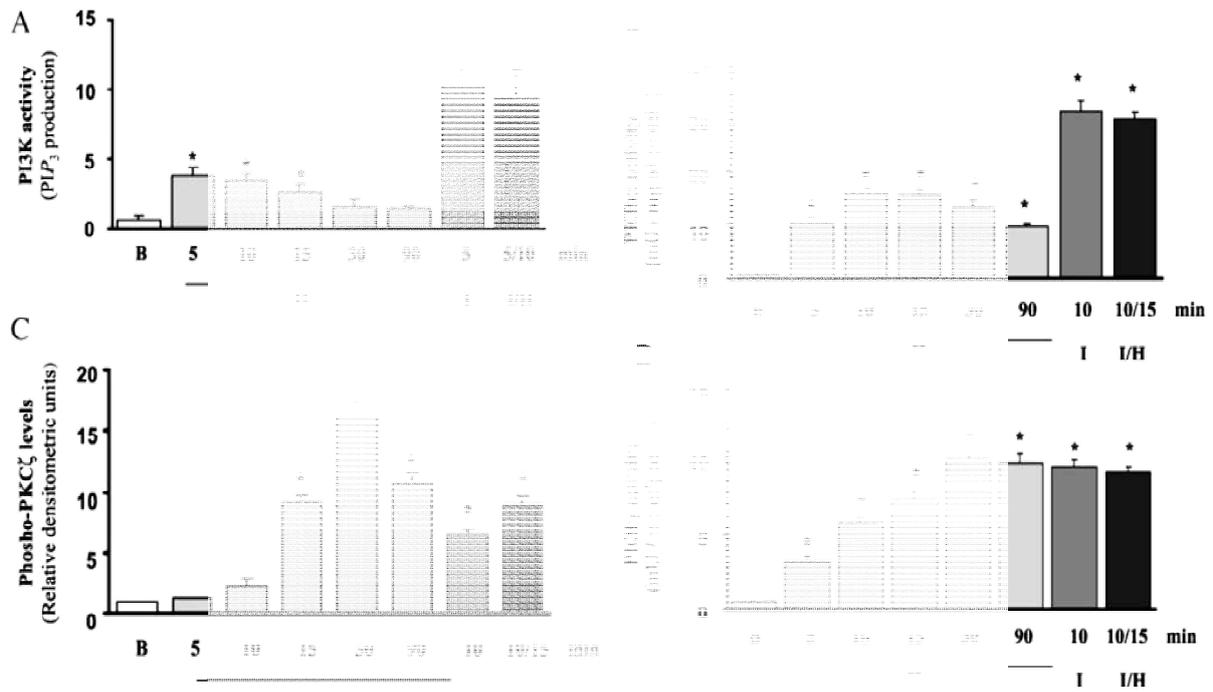


FIGURE 14: CAPTATION DE GLUCOSE INDUITE PAR L'INSULINE (I), LA NRG1 (H) OU LES DEUX DANS DES CELLULES L6E9 DE RATS. (D'après Suarez et al, 2001)

Les expérimentations sur l'absorption de 2-désoxyglucose ont été réalisées sur culture cellulaires. Des myotubes L6E9 différenciés ont été incubés durant 90 min avec 3 nM de NRG1 (H) ou 30 min avec 1 mM d'insuline (I) ou avec l'insuline et la NRG1 (I + H). Les valeurs d'absorption du 2-désoxyglucose sont exprimées par mg de protéine après soustraction des valeurs de fond. Les valeurs sont la moyenne  $\pm$  SE. \* Différence significative avec le groupe basal  $p < 0,01$ . † Différence significative avec le groupe Insuline (I) ou NRG1 (H). Le taux de transport basal était de  $0.97 \pm 0.10$  pmol de 2-désoxyglucose/mg de protéine  $3 \times 10$  min. B : Basal.

Cette étude a montré une stimulation de la captation du glucose aussi bien sur culture de cellules musculaires (L6E9) que sur muscles ex-vivo (Soleus), dépendante de l'activation de la PI3K (Phosphatidylinositol3 Kinase). Cet effet semble commun à différents types de cellules musculaires puisqu'une captation de glucose a également été induite sur des cultures de cardiomyocytes isolés (Cote et al, 2005) et impliquait la même voie de signalisation. Sur culture cellulaire de muscle squelettique, l'amplitude de cette stimulation s'avère équivalente à celle induite par l'insuline. Il est même surprenant d'observer un effet additif, suggérant des voies de signalisations indépendantes entre NRG1 et insuline.

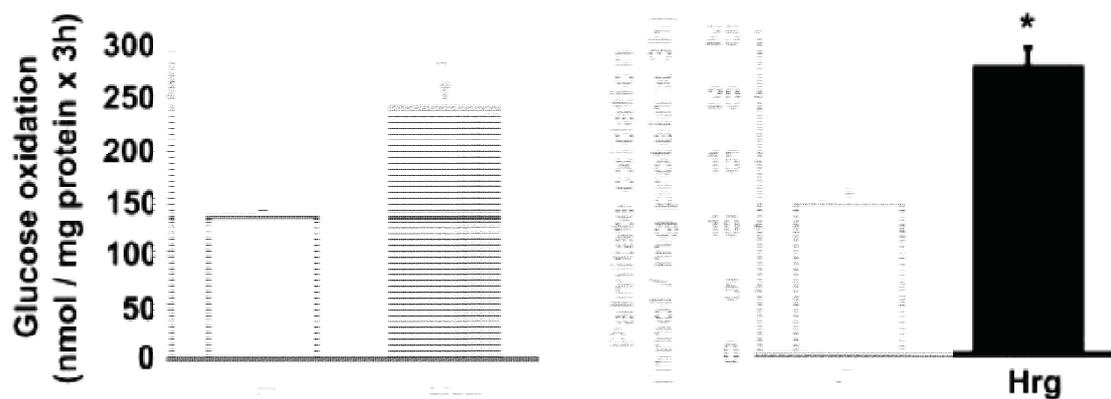
Ce phénomène rappelle les récentes études réalisées sur des cellules humaines de cancer du sein. Dans ce modèle, la surexpression du récepteur ErbB2 permet un ensemble d'adaptations métaboliques à l'origine d'une captation de glucose indépendante de l'insuline (Bollig-Fischer et al, 2011). Dans le muscle squelettique, sous l'effet de la NRG1, les transporteurs de glucose transmembranaires GLUT4 sont transloqués vers la membrane sarcolemmale (Suarez et al, 2001). Ce processus est rendu possible par l'activation de la PI3K (Suarez et al, 2001), de la PKC $\xi$  (protein kinase C $\xi$ ) et de la PDK1 (3-phosphoinositide-dependent protéine kinase-1) (Canto et al, 2004 ; Canto et al, 2006). Cette cascade est partiellement partagée avec l'insuline (Bandyopadhyay et al, 1999) mais aucun effet additif de la NRG1 n'a été observé sur l'activation de ces protéines de signalisation (Figure 12 ; Canto et al, 2004).



**FIGURE 15: LA NRG1 (H), L'INSULINE (I) OU LES DEUX ACTIVENT PI3K, AKT (PKB) ET PKC DANS DES CELLULES MUSCULAIRES L6E9 DE RATS. (D'après Canto et al, 2004)**

Les expérimentations ont été réalisées sur culture de myotubes L6E9 de rats. Les cellules ont été traitées avec 3 nM de NRG1 (H) et/ou 1 mM insuline (I) pendant les temps indiqués sur la figure. L'analyse des résultats de western blot a été réalisée par densitométrie. Ont été analysés les formes basales et phosphorylées de (A) PI3K, (B) AKT1 (PKB $\alpha$ ), (C) PKC, (D) AKT3 (PKB $\gamma$ ). Les résultats sont exprimés par rapport aux valeurs de basales. B valeurs basales. Les valeurs sont la moyenne  $\pm$  SE. \*Différence significative avec les valeurs basales  $p < 0,01$ .

Utilisée de manière chronique, la NRG1 permet aussi d'augmenter le pool de GLUT4 et l'insulino-sensibilité dans des cellules musculaires L6E9 (Canto et al, 2007). Les auteurs suggèrent que les effets observés sur la sensibilité à l'insuline seraient médiés par la fonction mitochondriale (Figure 13). En effet, il a été montré que le traitement chronique de cellules musculaires avec de la NRG1, à des concentrations non myogéniques (pM), entraîne l'augmentation de l'expression de PGC-1 $\alpha$  et PPAR $\delta$  (Canto et al, 2007).



**FIGURE 16: EFFET D'UN TRAITEMENT CHRONIQUE (48H) AVEC DE LA NRG1 (HRG) SUR L'OXIDATION DES SUBSTRATS DANS DES CELLULES MUSCULAIRES L6E9 DE RAT. (D'après Canto et al, 2007)**

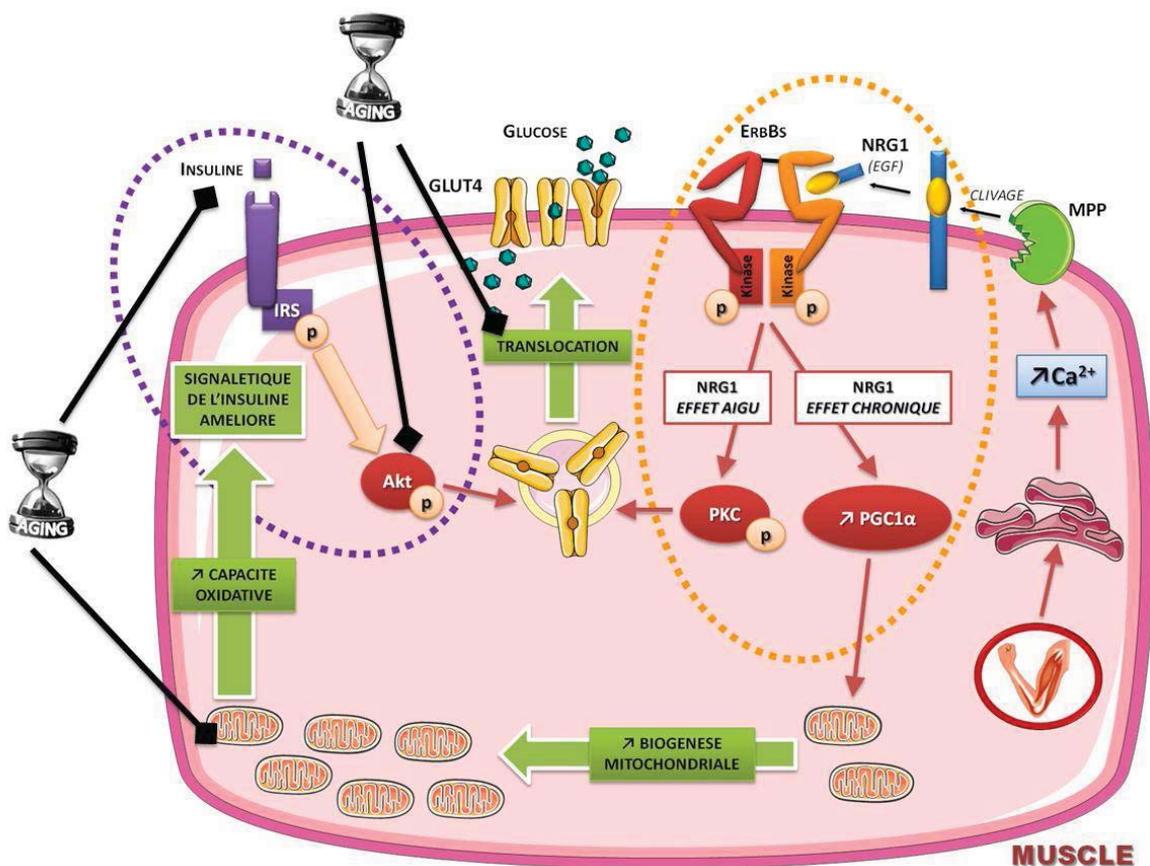
Des myotubes L6E9 de rat ont été traités avec 3 pmol/L de NRG1 (Hrg) pendant 48 h. A: Total des lysats cellulaires (? 10-40 g) ont été utilisés pour l'analyse Western blot des protéines indiquées. L'oxydation du glucose et du palmitate d'oxydation ont été réalisés par incubation dans un milieu Hank avec du glucose ou du palmitate radiomarqué. Les valeurs sont la moyenne  $\pm$  SE. \*Différence significative avec les valeurs basales p <0,01.

Ces facteurs de transcription sont également impliqués dans l'adaptation du muscle à l'exercice (Baar et al, 2002; Goto et al, 2000). Ce qui rappelle l'importance de la capacité oxydative dans les performances physiques et notamment dans la consommation maximale d'oxygène (VO<sub>2</sub>max) (Laursen 2010). Or, une étude a montré la corrélation entre la concentration plasmatique de NRG1 et le VO<sub>2</sub>max lors d'un test d'effort (Moondra et al, 2009). Par ailleurs, l'exercice physique est caractérisé par des cycles de contraction musculaire. Or, la contraction est un stress cellulaire à même d'exercer lui aussi un effet additif à l'insuline sur la captation du glucose (Douen et al, 1990). Compte tenu des résultats présentés plus haut, la question du rôle joué par la NRG1 lors de ce mécanisme est très intéressante.

#### 2.1.2.1.2 CONTRACTION MUSCULAIRE, CAPTATION DU GLUCOSE ET NRG1

La NRG1 semble jouer différents rôles durant la contraction des tissus musculaires. Au niveau du muscle squelettique la NRG1 induit la captation du glucose tandis qu'au niveau cardiaque elle agit sur le couplage excitation-contraction en accélérant de la recapture du Ca<sup>2+</sup> (Lebrasseur et al, 2003 ; Brero et al, 2010). La contraction musculaire induit un transport glucidique accru via l'augmentation de la concentration en Ca<sup>2+</sup> intracellulaire et celle de la 5'-AMP activant respectivement la CAMK2 (calcium/calmoduline Kinase2) et l'AMPK (Adénosine MonoPhosphate Kinase) (Wright et al, 2004). Or, une étude a montré que la NRG1 est clivée, durant la

contraction, par une métalloprotéase calcium dépendante provoquant ainsi l'effusion de fragments EGF et induisant la formation et l'activation du dimère ErbB2/ErbB4. De plus, le blocage du récepteur ErbB4 au moyen d'un anticorps monoclonal spécifique semble diminuer la captation de glucose induite par la contraction. Cette diminution s'avère de l'ordre de 71% dans le muscle oxydatif et 36% dans le muscle glycolytique (Canto et al, 2006). Bien que la CAMK2 ne soit pas directement activée par la NRG1, son inhibition altère la captation du glucose induite par la cytokine. Ceci suggère fortement une relation directe entre l'activation de PKC $\xi$  par les ErbBs et l'activation de la CAMK2 durant la contraction.



**FIGURE 17: INTERACTIONS ENTRE LA VOIE NRG1/ERBB ET CELLE DE L'INSULINE DANS LE MUSCLE SQUELETTIQUE. MISE EN PERSPECTIVE AVEC L'EFFET DU VIEILLISSEMENT SUR LA VOIE DE L'INSULINE ET SES ROLES SUR L'HOMEOSTASIE GLUCIDIQUE.** [D'après les travaux de Suarez et al. 2001 ; Canto et al. 2004, 2006 et 2007]

Lors d'une contraction musculaire, l'influx de Ca<sup>2+</sup> cytoplasmique active une métalloprotéase (MPP) qui va cliver la forme transmembranaire de la NRG1 et libérer le domaine EGF. Le domaine EGF de la NRG1 phosphoryle ses récepteurs ErbBs qui activent PKC et ainsi la translocation des GLUT4 à la membrane sarcolemmale. L'insuline en se fixant à son récepteur (IR) active sa voie de signalisation intracellulaire et notamment AKT qui va ensuite induire, entre autre, la translocation des GLUT4 à la membrane sarcolemmale. Le vieillissement (Sablier) ou les facteurs délétères qui y sont associés perturbent les mécanismes induits par l'insuline. Les traits terminés par des flèches représentent une stimulation. Les traits terminés par un losange une inhibition. Zone violette : voie de l'insuline.

Toutefois, la relation entre NRG1 et métabolisme glucidique n'est pas unidirectionnelle. Si dans les tissus musculaires la NRG1 semble positivement impacter l'homéostasie glucidique, lorsque l'on considère le foie, l'insuline et la NRG1 apparaissent concurrentielles au lieu de synergiques.

### **2.1.2.2 INTERACTION ENTRE NRG1 ET INSULINE AU NIVEAU HEPATIQUE**

#### **2.1.2.2.1 UNE EXPRESSION HEPATIQUE DES ERBBs SELON L'ETAT METABOLIQUE**

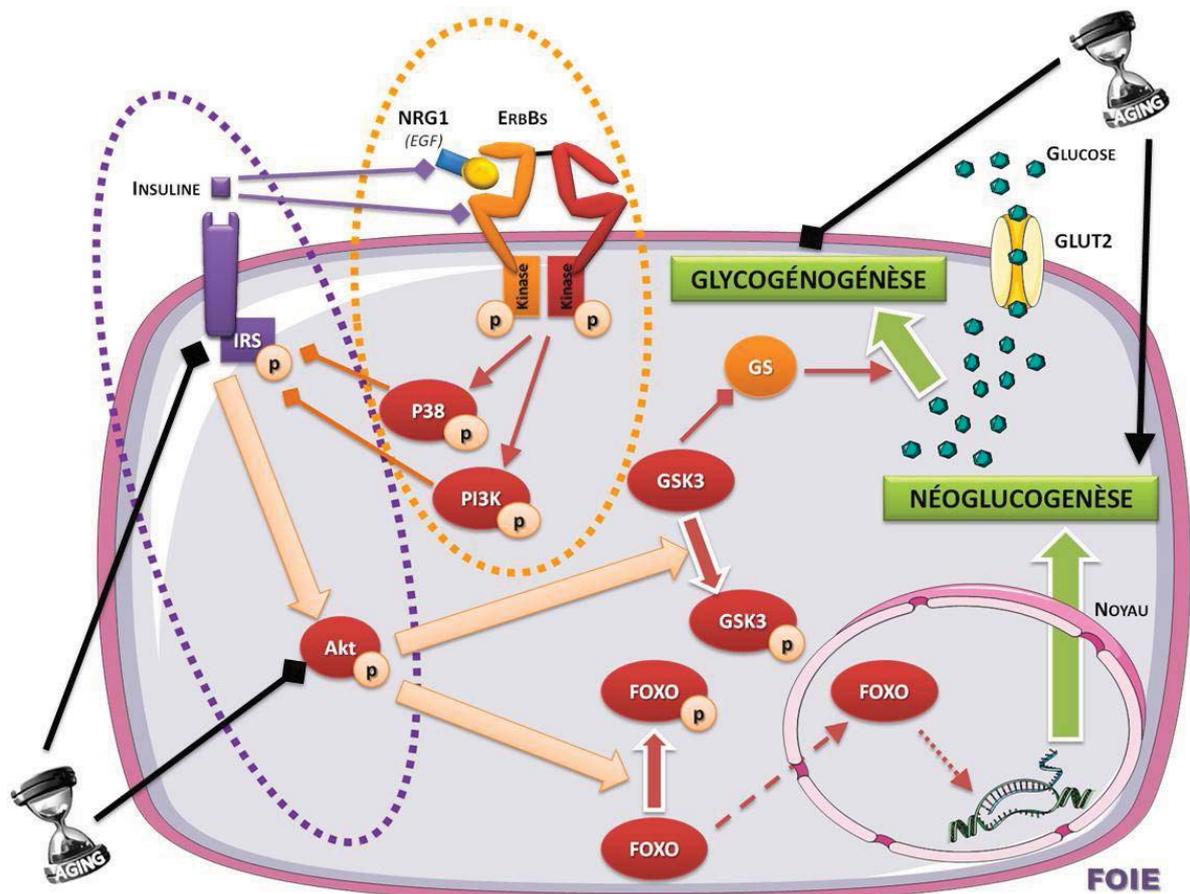
Les récepteurs ErbBs sont exprimés au niveau hépatique durant le développement et selon un rythme circadien (Carver et al, 2002). Le foie adulte exprime en grande quantité les récepteurs EGFR (ErbB1) et ErbB3 tandis que le récepteur ErbB4 n'est rapporté qu'en très faible quantité (Camprecios et al, 2011). Le récepteur ErbB2 est absent à l'âge adulte car après un rôle majeur durant la phase foetale, il disparaît à partir de la deuxième semaine de développement postnatal (Carver et al, 2002). Durant et au terme du développement, aucun changement majeur n'a été détecté dans le taux de protéines ErbB1. Le profil de développement des protéines ErbBs dans le foie prédit les différentes capacités de signal de ces récepteurs à différents stades de développement. Alors que seuls ErbB1 et ErbB3 semblent disponibles pour former des paires hétérodimériques dans le foie adulte (Carver et al, 2002 ; Camprecios et al, 2011), les appariements entre ErbB1, ErbB2 et ErbB3 sont possibles chez le fœtus (Carver et al, 2002).

De plus, il a été montré que les animaux adultes ont des patterns d'expression circadiens pour ErbB1 et ErbB3. L'expression d'ErbB3 et dans une moindre mesure d'ErbB1 est augmentée, par six et deux respectivement, tard durant la phase diurne et tôt durant la phase nocturne (Carver et al, 2002). Pour les modèles animaux utilisés, cette même période est également la fin de la période de repos ou les niveaux de glycogène et d'insuline sont donc les plus bas (Carver et al, 2002). De plus, l'expression d'ErbB3 est augmentée dans un modèle de rat insulino-dépendant (Streptozotocine), ceci suggérant fortement un rôle de régulation par l'état métabolique de l'animal (Carver et al, 2002 ; Carver et al, 1997).

#### **2.1.2.2.2 INTERACTION COMPETITIVE ENTRE NRG1 ET INSULINE**

La régulation de l'expression des ErbBs, en fonction de l'état nutritionnel des animaux corrobore les études préliminaires ayant montré que l'expression d'ErbB3 est inhibée par l'insuline à la fois *in vitro* et *in vivo* (Carver et al, 1996). Cette action

semble médiée par la voie PI3K alors même que la P70S6K (Carver et al, 1997), l'AMPc (Heyworth and Houslay, 1983) et la PKC (Cooper et al, 1990) n'ont pas de rôle dans ce mécanisme. En plus de diminuer les niveaux d'ARNm et de protéines ErbB3, l'insuline altère également la fixation de la NRG1 sur ce récepteur (Carver et al, 1996).



**FIGURE 18: INTERACTIONS ENTRE LA VOIE NRG1/ERBB ET CELLE DE L'INSULINE DANS LE FOIE. MISE EN PERSPECTIVE AVEC L'EFFET DU VIEILLISSEMENT SUR LA VOIE DE L'INSULINE ET SES ROLES SUR L'HOMEOSTASIE GLUCIDIQUE.** [D'après les travaux de Hemi et al. 2002 et 2011 ; Carver et al. 1996 et 1997]

Le domaine EGF de la NRG1 phosphoryle ses récepteurs ErbBs qui activent P38 ou PI3K et, selon un mécanisme encore inconnu, induisent la phosphorylation en sérine d'IRS1 qui perturbe sa fonction. L'insuline provoque une baisse de l'expression d'ErbB3 et perturbe la fixation de la NRG1 (EGF) sur ErbB3. L'insuline en se fixant à son récepteur (IR) active sa voie de signalisation intracellulaire et notamment AKT. D'une part, cette activation va induire la phosphorylation de FOXO ou *Forkhead box protein O1*, l'empêchant ainsi de pénétrer dans le noyau et d'exercer son activité transcriptionnelle. D'autre part, ceci va lever l'inhibition de la glycogène synthétase (GS) via la phosphorylation de la glycogène synthétase kinase 3 (GSK3). Ces signaux cellulaires vont stimuler la synthèse de glycogène et inhiber la néoglucogenèse. Le vieillissement (sablier) ou les facteurs délétères qui y sont associés perturbent ces mécanismes induits par l'insuline. Les traits terminés par des flèches représentent une stimulation. Les traits terminés par un losange une inhibition. Zone violette : voie de l'insuline. Zone orange : voie de NRG1/ErbB.

A l'inverse, certaines études ont montré un mécanisme inhibiteur opposé entre la NRG1 et l'insuline. En effet, la NRG1 et le TNF $\alpha$ , un médiateur connu de la résistance à l'insuline dans le diabète de type 2, sont capables d'induire la phosphorylation en sérine du substrat du récepteur à l'insuline (Hémi et al, 2002). Ce phénomène est induit par la transactivation des récepteurs ErbB2 et ErbB3 permettant l'association avec la sous-unité p85 de PI3K (Hémi et al, 2002). Il faut cependant préciser que ce résultat est obtenu sur des cellules Fao d'hépatome humain qui surexpriment ErbB2 (Carver et al, 2002). D'un point de vue général, la littérature et nos propres investigations tendent à prouver que les cultures cellulaires présentent souvent un phénotype fœtal de la voie NRG1/ErbB. Plus récemment, la même équipe a confirmé que la phosphorylation d'IRS1 en sérine se produit via la transactivation des ErbBs. Des souris ob/ob ont été utilisées dans cette étude et la protéine p38 MAPK a été montrée comme médiatrice de cet effet (Hémi et al, 2011).

L'ensemble de ces résultats montrent des interactions fortes entre la voie de la NRG1 et celle de l'insuline. Bien entendu, cela pose la question du rôle exact de la NRG1 dans le développement ou la progression de l'insulino-résistance. Certaines données scientifiques récentes mais plus anecdotiques confirment les interrogations soulevées sur les tissus musculaires et hépatiques.

### **2.1.2.3 NRG1/ERBB ET INSULINO-RESISTANCE : LA POULE OU L'ŒUF ?**

Les relations cellulaires entre voie de l'insuline et de la NRG1 n'ont pas été explorées uniquement dans le foie et le muscle squelettique. En effet, sur des cellules cardiaques, la réalisation d'un traitement au palmitate, modèle bien connu d'induction d'une insulino-résistance, altère négativement les effets cellulaires de la NRG1 (Miller et al, 2009). L'altération de la fonctionnalité de la NRG1 serait dans ce cas un facteur potentiel d'aggravation. Cette approche semble renforcée par la corrélation positive entre taux plasmatique d'ErbB2 et insulino-résistance qui a été observée chez des patients obèses (Fernandez-Real et al, 2010). La perte de poids chez ces patients ayant réduit ce taux, la libération de ce récepteur au niveau plasmatique pourrait être la conséquence d'une altération de la voie NRG1/ErbB. Ce résultat n'est pas sans rappeler le rôle joué par ErbB2 sur la captation du glucose dans certaines cellules de cancer du sein (Bollig-Fischer et al, 2011).

Toutefois, une étude génétique prospective a montré une corrélation forte entre le polymorphisme génétique des protéines de la voie NRG1-4/ErbB et la susceptibilité de développer un diabète de type 2 (Pickrell et al, 2009). A l'inverse des éléments évoqués plus haut, cette observation place la fonctionnalité de la voie en amont de la perturbation métabolique.

***Les études qui se sont intéressées au rôle métabolique de la NRG1 ont clairement montré que cette protéine pourrait influencer sur l'homéostasie du glucose. Toutefois, les auteurs ont essentiellement réalisé leurs investigations sur des modèles cellulaires de foie et de muscle. Avant les travaux réalisés par notre équipe, pratiquement aucune donnée systémique n'était disponible dans la littérature. De plus, les résultats obtenus sur le muscle et le foie sont contradictoires. Ceci ne permet pas d'émettre une hypothèse orientée quand à l'implication positive ou négative de la NRG1 sur le métabolisme du glucose. Enfin, quelques publications suggèrent que l'insulino-résistance influence ou est influencée par la voie de la NRG1.***

### **2.1.3 SYNTHÈSE ET PERSPECTIVES**

L'activité métabolique est hautement impliquée dans la durée de vie des organismes vivants notamment via l'occurrence des pathologies qui y sont associées (Riera et Dillin, 2015). Or, une corrélation entre la durée de vie de certaines espèces de mammifères et le taux plasmatique de NRG1 a été trouvée (Edrey et al, 2012). Compte tenu du rôle majeur du métabolisme énergétique dans la longévité (Riera et Dillin, 2015), la corrélation entre NRG1 et celle-ci suggère, indirectement, un rôle métabolique.

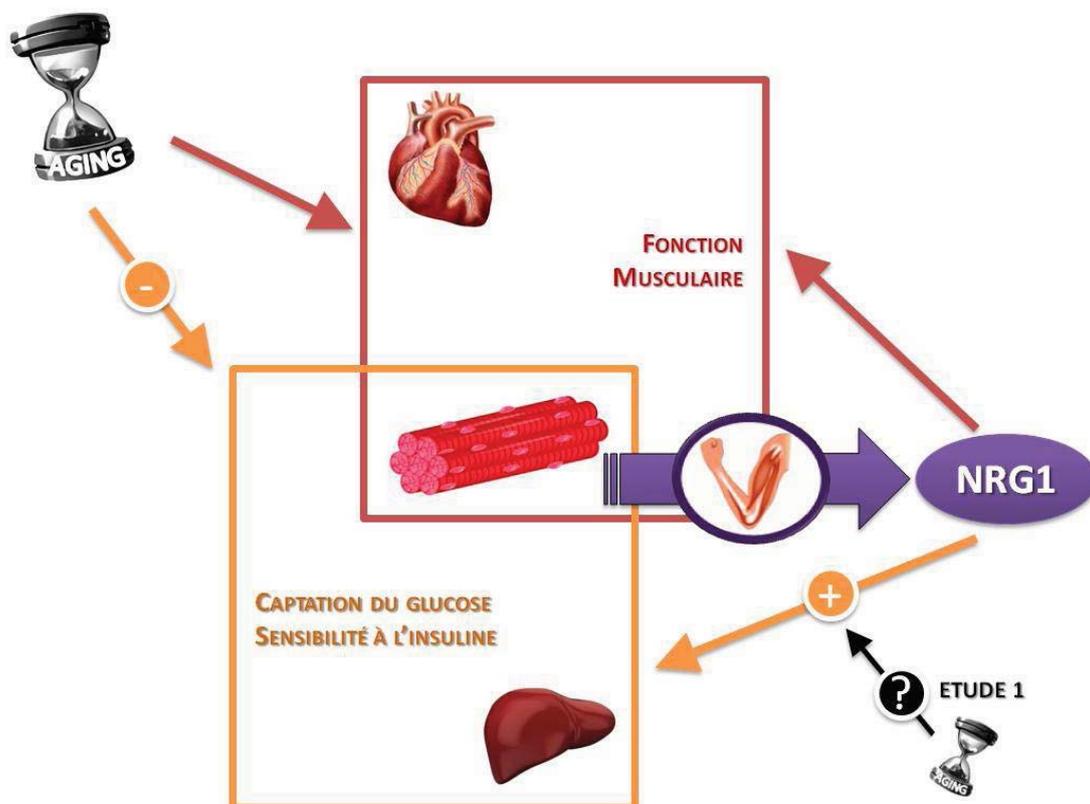
Les études sur le muscle et le foie montrent que ce rôle est centré sur le métabolisme du glucose. Elle agit, soit directement via la captation du glucose, soit indirectement via des interactions complexes entre sa signalétique cellulaire et celle de l'insuline. Or, les perturbations de l'homéostasie du glucose sont courantes chez la personne âgée et prennent particulièrement source dans le développement d'une résistance périphérique à l'insuline. Au regard de ces homologues entre perturbations métaboliques liées à l'âge et effet de la NRG1, il est surprenant qu'aucune étude n'ait exploré le lien entre les deux.

Ces questions relatives à l'homéostasie glucidique sont soulevées dans un contexte de vieillissement mais peuvent tout aussi bien l'être dans un contexte d'obésité ou de diabète. De fait, en parallèle du travail de recherche présenté dans ce manuscrit, j'ai participé à d'autres études réalisées dans le laboratoire sur les thématiques de l'obésité et du diabète. Ces travaux ont d'ores et déjà été publiés dans le même laps de temps (Ennequin et al, 2015a ; Ennequin et al, 2015b ; Ennequin et al, 2015c) et ont été placés en annexes. Toutefois, cela ne sera pas développé plus en profondeur dans ce manuscrit, car ne concernant pas directement mon travail de recherche.

Les études réalisées sur la NRG1 et le métabolisme du glucose ont laissé, de part leur choix méthodologiques, de nombreuses questions en suspens qui nécessitent également un approfondissement scientifique.

L'objet de la première étude sera donc de répondre à un certain nombre d'interrogations et d'y adjoindre le contexte du vieillissement.

- Quel est l'impact de la NRG1 sur le métabolisme du glucose *in vivo* et au niveau systémique ?
- Existe-t-il une différence entre les modèles cellulaires et un organisme adulte ?
- Quel(s) organe(s) sont stimulés par la NRG1 *in vivo* et quel est leur rôle respectif ?
- Le processus de vieillissement a-t-il un impact sur l'expression de la NRG1 et de ses récepteurs ?
- Le vieillissement altère-t-il la fonctionnalité de la voie NRG1/ErbB ?



*Dans la partie précédente, le recoupement entre voie NRG1/ErbB et âge a été développé dans le champ de l'homéostasie glucidique. Cette deuxième partie sera consacrée à l'impact du vieillissement sur le tissu musculaire squelettique et aux rôles potentiels de la NRG1 dans ce contexte.*

## **2.2 NRG1, VIEILLISSEMENT ET FONCTION MUSCULAIRE**

L'ensemble des altérations physiologiques liées à l'âge se traduisent par une perte d'autonomie et un risque accru de mortalité. En effet, le vieillissement musculaire est caractérisé par une perte de masse ainsi qu'une dégradation de ses propriétés contractiles. Ces modifications ont pour conséquence un déficit fonctionnel majeur chez certaines personnes âgées. Ces modifications tissulaires sont intimement liées à une dérégulation métabolique globale, qui inclut notamment une insulino résistance, une diminution de la fonction mitochondriale et un état inflammatoire chronique. L'origine de la fonte musculaire ne prend cependant pas sa source uniquement dans des facteurs circulants ou internes aux cellules musculaires. Les phénomènes apoptotiques dans le système nerveux périphérique et l'altération de la jonction neuromusculaire participent eux aussi à la dégradation du tissu musculaire.

L'exercice physique et la nutrition restent les deux principaux outils de prise en charge recommandés (Narici et Maffulli, 2010). En effet, ils bénéficient d'une efficacité et d'un rapport bénéfices-risques avantageux pour cette population âgée. Les mécanismes cellulaires responsables des améliorations liées à l'exercice chez la personne âgée sont encore mal connus. Certaines cytokines libérées lors de l'exercice physique pourraient intervenir et présente un intérêt scientifique grandissant (Pedersen et Febbraio, 2012). En particulier, l'exercice physique semble réguler l'expression et le clivage des protéines de la voie NRG1/ErbB.

La NRG1 a montré depuis longtemps un rôle myogénique, une capacité à stimuler la synthèse protéique et le processus de régénération musculaire. De plus, il a été montré que la NRG1 joue un rôle dans le métabolisme musculaire et l'intégrité de la jonction neuromusculaire.

L'exploration du rôle de la NRG1 dans le vieillissement musculaire pourrait permettre la compréhension de certains mécanismes associés à l'exercice physique.

## 2.2.1 LA SARCOPENIE

L'objectif de cette partie sera de mettre en avant les perturbations de la cellule musculaire âgée ou de son environnement qui évoquent les rôles physiologiques de la NRG1. Une synthèse plus exhaustive des phénomènes physiopathologiques est décrit dans de nombreuses revues de la littérature (Bijlsma et al, 2013 ; Marzetti et al, 2013 ; Jensen 2008).

### 2.2.1.1 DEFINITION ET CONSEQUENCES FONCTIONNELLES

La sarcopénie, terme proposé en 1989 par Rosenberg, définit la perte de masse musculaire spécifiquement liée à l'âge (Rosenberg 1997). La notion de perte de force a rapidement été également incluse dans la définition compte tenu de son importance fonctionnelle (Evans 1995).

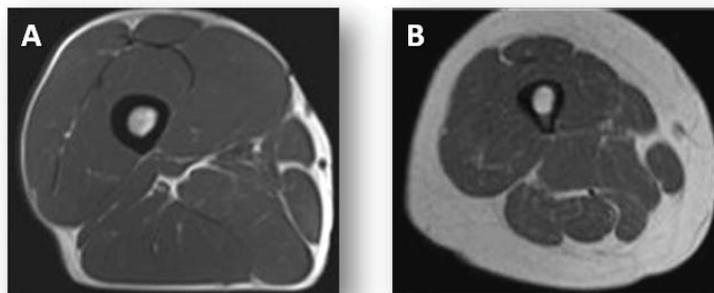


FIGURE 19: IRM DES MUSCLES DU MEMBRE INFÉRIEUR D'HOMME ADULTE ET ÂGÉ

(D'après Palmio et Udd, 2014)

Imagerie musculaire des muscles de la cuisse (ischio-jambiers et quadriceps) chez un homme (A) adulte (40 ans) et (B) âgé (73 ans). On observe une nette diminution du volume musculaire ainsi qu'une légère augmentation des tissus gras intramusculaire avec l'âge (B).

Toutefois, bien que la perte de matériel contractile entraîne par définition une diminution de la force, on observe également une diminution de la force dite « spécifique » (ST) ainsi que de la vitesse de contraction (De Haan et al, 1993 ; Hook et al, 2001), témoins indirects d'une altération de la « qualité » musculaire lors du vieillissement. Cette perte de qualité musculaire s'est vu attribuée par certains le terme de « Dynapénie », ceci dans le but de marquer une différenciation entre la perte de masse et la perte de fonctionnalité indépendante de cette atrophie (Clark et

Manini, 2008). Une observation histologique du muscle âgé révèle notamment des inclusions lipidiques et une fibrose dans le tissu musculaire âgé (Cree et al, 2004 ; Goldspink et al, 1994), ce qui explique pour partie la diminution de force spécifique du fait d'une diminution relative des éléments contractiles.

Il sera décrit les facteurs intrinsèques à la cellule musculaire et à sa capacité individuelle à répondre à un stimulus environnemental. Ensuite seront relatés certains facteurs extrinsèques notamment la relation entre la cellule musculaire âgée et d'autres cellules de son environnement immédiat.

### **2.2.1.2 FACTEURS INTRINSEQUES**

Au sein même de la cellule musculaire, le processus de vieillissement va modifier les flux anaboliques et cataboliques. Ces altérations vont toucher à la fois la fourniture en protéines fonctionnelles (turn-over protéique) et en énergie via le métabolisme mitochondrial.

#### **2.2.1.2.1 ALTERATION DU TURN-OVER PROTEIQUE**

L'altération de l'équilibre entre protéosynthèse et protéolyse figure parmi les facteurs clés de la sarcopénie (Marzetti et al, 2013). Néanmoins, ces deux processus sont fortement modulables en fonction des signaux perçus par la cellule musculaire. Dans un premier temps, il est donc important de comprendre l'effet du vieillissement à l'état basal, soit en l'absence de stimulations extracellulaires (Nutrition, AP).

##### ***2.2.1.2.1.1 Equilibre protéosynthèse/protéolyse à l'état basal***

A l'état basal, il semble que la protéolyse ne soit pas ou peu affectée chez l'humain (Welle et al, 1995 ; Balagopal et al, 1997 ; Volpi et al, 2001). Curieusement, il semble en être de même pour le flux de synthèse protéique basal (Volpi et al, 2001 ; Volpi et al, 2000 ; Cuthbertson et al, 2005). Au niveau cellulaire, la balance protéosynthèse/protéolyse est principalement régulée par le niveau d'expression et d'activation de la serine/thréonine kinase Akt et des protéines de sa voie de signalisation. La protéine Akt est activée par la protéine PI3K elle-même phosphorylée par le domaine kinase intracellulaire d'un récepteur ou par les protéines FAK (Focal Adhesion Kinase) sensibles au stress mécanique (Sakamoto et al, 2002). Or, si de nombreux chercheurs considèrent qu'il existe une diminution de l'expression et de l'activation des éléments constitutifs de la voie PI3K/Akt/mTOR au cours du vieillissement, cette assertion reste toutefois sujette à controverse. A titre

d'exemple, la phosphorylation de mTOR et p70S6K chez des rats sénescents (Fischer 344) est augmentée de 70-75% dans le jambier antérieur (TA) par rapport à de jeunes rats (Parkington et al, 2004). Egalement, (Kimball et al, 2004) ont montré que, dans le muscle jumeau, le niveau de p70S6K phosphorylée a augmenté durant l'avancée en âge (12 à 27 mois). Cette observation reste toutefois concomitante d'une baisse apparente de l'activité d'Akt (Kimball et al, 2004). Par ailleurs, d'autres équipes ont également montré cette diminution de la phosphorylation d'Akt dans le muscle de mammifères âgés (Haddad et Adams, 2006 ; Léger et al, 2008). A contrario, Rahnert et al (2011) ont observé une baisse (Thr421/Ser424) ou aucune différence (Thr389) de la p70S6K phosphorylée, dans le biceps brachial, en fonction du site de phosphorylation investigué. En définitive, à l'état basal, il n'existe pas à l'heure actuelle de consensus sur les modulations de la voie PI3K/Akt/mTOR dans le muscle âgé. Ceci s'explique assez facilement par les multiples facteurs confondants tel que l'âge, le comportement, ou encore le fond génétique des sujets inclus.

Toutefois, cette absence de différence n'est valable qu'à l'état basal et lors d'une stimulation nutritionnelle ou contractile on observe une différence notable liée au vieillissement.

#### **2.2.1.2.1.2 Stimuli et variation de l'équilibre protéosynthèse/protéolyse**

##### 2.2.1.2.1.2.1 Stimuli nutritionnels

En période postprandiale, on observe une importante baisse de réponse aux stimuli nutritionnels anaboliques avec l'avancée en âge aussi bien sur modèles animaux (Balage et al, 2010) que chez l'humain (Cuthbertson et al, 2005 ; Guillet et al, 2004). Guillet et al (2004) furent parmi les premiers à montrer que la capacité de l'insuline et des acides aminés ramifiés (BCAA) à initier une synthèse protéique était réduite avec l'âge (Guillet et al, 2004). Une réponse vasodilatatrice émoussée du muscle âgé participerait à ce phénomène via un apport en insuline et en éléments nutritifs diminué (Rasmussen et al, 2006). La diminution de la réponse protéo-synthétique aux acides aminés est d'environ 40% chez l'homme de 70ans (Cuthbertson et al, 2005).

On retrouve un phénomène similaire sur l'autre versant de la balance anabolique protéique avec une diminution de la capacité de régulation de la dégradation protéique. Wilkes et al. ont en effet montré qu'en période postprandiale l'inhibition de

la protéolyse par l'insuline est abaissée chez les personnes âgées. Évaluée dans les muscles du membre inférieur, la baisse de la protéolyse est de 12% chez les personnes âgées contre 47% pour le groupe jeune (Wilkes et al, 2009).

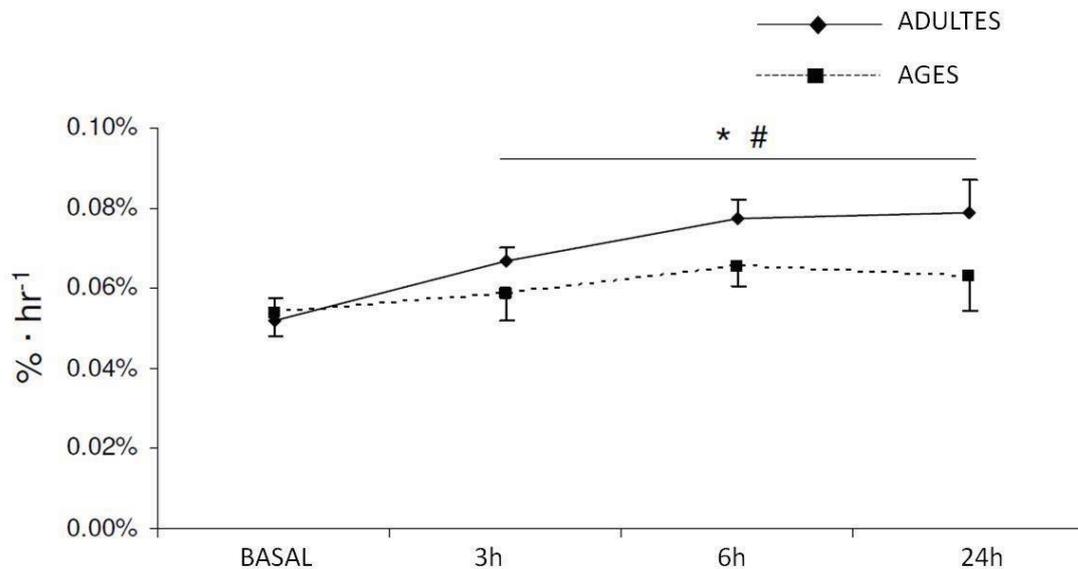
En accord avec ces résultats sur le turn-over protéique, le muscle âgé montre un déficit marqué de la réponse cellulaire aux stimuli nutritionnels.

On observe donc une résistance aux signaux tels que les acides aminés ramifiés (BCAA) ou l'insuline. L'élévation de l'insuline en période postprandiale est habituellement suffisante pour induire l'anabolisme musculaire (Fujita et al, 2009). Toutefois, chez des sujets âgés (~70ans), des doses supra-physiologiques d'insuline s'avèrent nécessaires pour stimuler la phosphorylation de la P70S6K et la protéosynthèse associée (Fujita et al, 2009). Les acides aminés et particulièrement le BCAA leucine sont également connus pour leur capacité à fortement stimuler la synthèse protéique via la voie mTOR chez le sujet jeune (Atherton et al, 2010). A contrario, deux études ont montré un déficit d'activation partiel (Cuthbertson et al, 2004) ou total (Guillet et al, 2004) de la P70S6K par les acides aminés respectivement administrés oralement ou par voie parentérale chez le sujet âgé.

Les recommandations cliniques sont unanimes en faveur de l'association d'exercices de renforcement musculaire aux stratégies nutritionnelles. Il est donc intéressant de connaître les effets du vieillissement sur la réponse à ce type de stimuli.

### 2.2.1.2.1.2.2 Stimulation par l'exercice physique

La diminution de la réponse protéo-synthétique chez les personnes âgées est observable également suite à des exercices de renforcement musculaire (Fry et al, 2011).



**FIGURE 20: REPONSE PROTEOSYNTHETIQUE SUITE A LA REALISATION D'UN EXERCICE DE RENFORCEMENT MUSCULAIRE CHEZ DES SUJETS JEUNES ET AGES. (D'après Fry et al, 2011)**

La synthèse des protéines musculaire est exprimée par la fraction d'augmentation du taux basal (%/heure) chez les sujets jeunes et âgés au repos et 3, 6 et 24 heures après l'exercice. \* Effet temps  $p < 0,05$ . # Significativement différent de sujets âgés  $p < 0,05$ .

En effet, Parkington et al. (2004) ont rapporté des niveaux inférieurs de phosphorylation de p70S6K et mTOR après stimulation électrique dans le muscle de rats sénescents (30 mois) par rapport à ceux de rats adultes (6 mois). En aval de mTOR, le même groupe a confirmé ce résultat et montré que, dans le muscle âgé, la stimulation électrique échoue à réprimer l'activité de 4E-BP1 (Funai et al, 2006). D'autres modèles d'hypertrophie, comme la surcharge chronique, ont également montré un déficit d'activation de la voie Akt/mTOR chez le rat âgé (Thomson et Gordon, 2006). Chez l'humain, c'est l'exercice aigu contre résistance (8 séries de 10 répétitions à 70% de la 1RM) qui augmente la phosphorylation de mTOR, P70S6K et 4E-BP1 uniquement chez les sujets jeunes (27ans) comparativement aux personnes âgées (70ans) (Fry et al, 2011).

### **2.2.1.2.1.3 Conclusion**

L'ensemble de ces résultats suggère donc à la fois un blocage de la réponse aux stimuli anaboliques (sensibilité et amplitude) mais également une réduction de la capacité d'inhibition de la protéolyse. Ces résultats ne doivent pas pour autant remettre en question l'utilité de l'exercice physique ou de la nutrition comme contre mesure de la sarcopénie (Dickinson et al, 2013). En effet, ces deux éléments semblent agir en synergie comme le souligne la restauration de l'effet anabolique de l'insuline après un exercice d'aérobic (Fujita et al, 2007). De même, on observe une réponse anabolique aux protéines de lactosérum administrées après un exercice de renforcement musculaire avec de surcroît un effet dose (D'Souza et al, 2014).

La capacité d'activation des voies anaboliques est un processus par ailleurs hautement dépendant du statut énergétique de la cellule musculaire (Kimball 2006). Ceci est très bien illustré par l'étude de Drummond et al. (2008) qui a fait réaliser un exercice physique associé à une supplémentation protéique à des patients jeunes et âgés (Drummond et al, 2008). Les auteurs observent un retard dans la réponse anabolique, en accord avec les données présentées, mais également une activation de l'AMPK uniquement chez les patients âgés. L'AMPK étant activé suite à une modification du rapport AMP/ATP (Kimball 2006), ce résultat suggère un déficit énergétique uniquement dans la cellule musculaire âgée. Or, la production d'ATP au niveau musculaire est essentiellement en provenance du métabolisme mitochondrial. La mitochondrie, outre son rôle dans le phénomène d'insulino-résistance, s'avère donc un élément essentiel du processus sarcopénique (Marzetti et al, 2013).

#### 2.2.1.2.2 METABOLISME ENERGETIQUE : DYSFONCTION MITOCHONDRIALE

Les fonctions vitales assumées par les mitochondries dans le cadre de la fourniture d'énergie, de la production d'espèces réactives de l'oxygène et de la régulation de plusieurs voies cataboliques confèrent à ces organites une position centrale dans le maintien de la viabilité des myocytes durant le vieillissement (Marzetti et al, 2013).

L'analyse d'échantillons de muscle squelettique de sujets sains a révélé une baisse significative de la masse mitochondriale avec l'âge (Welle et al, 2003). Cette baisse était concomitante de celle des activités des enzymes du cycle de Krebs (Crane et al, 2010), de la consommation d'oxygène (Joseph et al, 2012 ; Coen et al, 2013), et de la synthèse d'ATP (Short et al, 2005). En outre, une diminution de 40 à 50% de l'activité de la phosphorylation oxydative a été observée *in vivo* par résonance magnétique nucléaire <sup>31</sup>P chez des personnes âgées comparées à des sujets plus jeunes (Conley et al, 2000 ; Petersen et al, 2003). De plus, de nombreuses preuves indiquent une altération marquée du renouvellement mitochondriale au cours du vieillissement musculaire, affectant la fonction de ces organites et l'homéostasie cellulaire (Calvani et al, 2013 ; Vina et al, 2009). L'expression de PGC-1 $\alpha$  (peroxysome proliferator activated receptor- $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$ ), l'un des co-activateurs transcriptionnels majeur de la biogénèse mitochondriale, est abaissée chez des animaux (Koltai et al, 2012) et des patients âgés (Safdar et al, 2010).

La perturbation du métabolisme mitochondrial a plusieurs conséquences, sur la physiologie musculaire, potentiellement à l'origine de la sarcopénie. D'abord, la diminution de la capacité de fourniture énergétique entraîne une altération de la stimulation de la protéosynthèse musculaire (Drummond et al, 2008). Ceci est vérifiable par le déclin concomitant de la capacité aérobie et de la protéosynthèse partiellement réversible avec un entraînement aérobie chez le sujet âgé (Short et al, 2004). D'autre part, la mitochondrie participe à la régulation de l'autophagie et de l'apoptose, deux mécanismes impliqués dans le vieillissement musculaire (Rajawat et al, 2009 ; Park et al, 2010)

La cellule musculaire âgée présente une résistance aux signaux anaboliques qui semblent, en partie, médiée par le métabolisme mitochondrial. Toutefois, la fonctionnalité du tissu musculaire dépend également de ses interactions avec son environnement cellulaire immédiat.

### **2.2.1.3 FACTEURS EXTRINSEQUES**

Parmi les éléments cellulaires environnementaux qui interagissent directement avec la physiologie musculaire on trouve le système nerveux périphérique et les cellules satellites. Ces facteurs extrinsèques sont tout particulièrement à mettre en perspective avec les rôles de la NRG1 dans le système nerveux et musculaire. Néanmoins, de nombreux autres facteurs externes à la cellule musculaire sont impliqués dans la sarcopénie. Parmi les plus cités on note l'altération du tissu vasculaire, la baisse des hormones anaboliques ou la hausse des facteurs inflammatoires (Narici et Maffulli, 2010).

#### **2.2.1.3.1 FACTEURS NERVEUX**

L'intégrité du tissu musculaire squelettique est en partie dépendante de la fonctionnalité du système nerveux moteur. A titre d'exemple, lors d'un entraînement chronique, de type renforcement musculaire, l'amélioration des performances est en premier lieu une conséquence des adaptations nerveuses (Carroll et al, 2001). Il n'est donc pas surprenant que l'innervation du muscle squelettique joue donc un rôle majeur dans la sarcopénie (Manini et al, 2013). Bien que des éléments centraux existent, il sera uniquement présenté les données concernant le système nerveux périphérique, les unités motrices, le motoneurone et la jonction neuromusculaire (JNM).

##### **2.2.1.3.1.1 Fonctionnalité des unités motrices**

Le vieillissement est associé à des changements morphologiques, physiologiques et comportementaux des unités motrices (Deschesnes et al, 2011). Le nombre d'unités motrices diminue progressivement au cours des six premières décennies de la vie mais il a été montré que la cinétique s'accélère par la suite (Gordon et al, 2004), ceci selon un modèle qui imite étroitement l'évolution de la Dynapénie<sup>3</sup> (Lauretani et al, 2003). Avec l'âge, les décharges des unités motrices présentent une plus grande variabilité, une réduction de leur amplitude et une moindre synchronisation lors des contractions musculaires (Shinoara et al, 2011). En outre, les vitesses de conduction des voies efférentes montrent une réduction marquée en fin de vie (Di Iorio et al, 2006).

---

<sup>3</sup> Perte de fonctionnalité indépendante de la perte de masse musculaire.

Des modifications au niveau du motoneurone ainsi qu'un remodelage de la JNM expliquent au moins en partie ces observations.

#### **2.2.1.3.1.2 Le motoneurone**

Les motoneurones des animaux et des humains âgés présentent une baisse du transport axonal et une structure mitochondriale altérée (Coleman et al, 2011 ; Cheng et al, 2010). Ces changements peuvent aboutir à une apoptose des motoneurones caractéristique des maladies neurodégénératives, pourtant observable chez certaines personnes âgées (Misgeld 2011). Il a été établi que les nerfs périphériques myélinisés provenant d'animaux âgés présentent une perte axonale, des irrégularités morphologiques ainsi qu'une réduction notable de l'expression de la myéline (Melcangi et al, 2011). Chez le sujet sain, les axones endommagés subissent un processus de dégénérescence et de régénération complexe qui est altéré et retardé par le vieillissement (Kovacic et al, 2009).

#### **2.2.1.3.1.3 La jonction neuromusculaire**

Le vieillissement est également associé à un remodelage de la JNM qui se caractérise par une rétractation des terminaisons nerveuses laissant des récepteurs post-synaptiques inoccupés (Deschenes. 2011). En conséquence, les JNM âgées développent une plaque motrice élargie. On pourrait supposer que le remodelage des JNM est une conséquence de l'atrophie musculaire. Cependant, ces modifications semblent précéder l'atrophie des fibres musculaires et pourraient donc être impliquées dans la perte musculaire (Deschenes. 2011).

Fait intéressant, les axones séparés de leur JNM ne montrent aucun signe d'atrophie (Prakash et Sieck, 1998). De plus, l'idée que le remodelage de la JNM se produise avant l'atrophie des fibres musculaires est contesté. Il a été constaté que la plupart des JNM restent stables tout au long de la durée de vie, mais se fragmentent lors de la régénération qui se produit suite à une blessure de la fibre musculaire (Li et al, 2011). Ces nouvelles données ne permettent pas encore de comprendre l'origine exacte du remodelage de la JNM mais la plaque motrice étant par définition une surface de communication, il est probable que des facteurs à la fois autocrines et paracrines soient impliqués.

Outre le motoneurone, d'autres cellules exercent un rôle de soutien sur les cellules musculaires.

Le pool de cellules satellites, à la périphérie de la fibre musculaire, qui s'active à chaque épisode de régénération est aussi impliqué dans le processus sarcopénique.

#### 2.2.1.3.2 CELLULES SATELLITES

Compte tenu du rôle des cellules satellites dans la croissance musculaire post-natale et la régénération du muscle adulte, il est logique que ces cellules jouent un rôle important dans la sarcopénie. Cette hypothèse est confirmée par les nombreuses études montrant une baisse du nombre de cellules satellites et/ou une perte de la fonctionnalité de celles-ci durant le vieillissement (Roth et al, 2000; Conboy et al, 2003; Shefer et al, 2006; Day et al, 2010; Chakkalakal et al, 2012; Sousa-Victor et al, 2014). Toutefois, les cellules satellites siègent au sein d'un microenvironnement appelé niche et il existe un débat sur le rôle respectif de la cellule satellite ou de son environnement dans la sarcopénie.

##### **2.2.1.3.2.1 La cellule satellite**

La transplantation de cellules satellites de jeunes souris chez des souris progéroïdes prolonge la durée de vie et améliore certains paramètres dégénératifs dans le muscle squelettique (Lavasani et al, 2012). A l'inverse, une transplantation de cellules satellites âgées aboutit à une diminution des capacités de régénération chez des souris adultes (Sousa-Victoretal, 2014). Malgré cela, la notion d'atteinte directe des cellules satellites est remise en question en tant que phénomène responsable de la sarcopénie (Fry et al, 2015). En effet, des études ont été menées avec un KO conditionnel pour Pax7 qui après activation présente un épuisement du pool de cellules satellites chez de jeunes souris. Les résultats montrent clairement que cette intervention n'a pas accéléré la perte de masse musculaire liée à l'âge, mais par contre elle a affecté la capacité de régénération du muscle squelettique (Fry et al, 2015). L'atrophie musculaire s'installera donc par cycle en fonction des stimuli imposés au système.

##### **2.2.1.3.2.2 La niche**

Comme évoqué précédemment ces cellules existent dans une niche qui se compose des cellules environnantes et de la matrice extracellulaire. Cet environnement fournit des signaux biochimiques et biophysiques orientant la régénération des fibres musculaires et l'auto-renouvellement des cellules satellites. Par conséquent, les changements liés à l'âge de la niche vont affecter le destin de ces cellules en

modifiant les signaux perçus. Ce faisant, certaines cellules satellites âgées ne réintègrent pas la quiescence comme dans le muscle squelettique jeune. Au contraire, ces cellules présentent une sénescence aberrante et échouent à prévenir la fibrose du tissu musculaire (Bracket al, 2007; Paliwal et al, 2012). Toutefois, les cellules satellites des muscles squelettiques jeunes et âgés semblent proliférer *ex vivo* de façon similaire (George et al, 2010; Alsharidah et al, 2013; Verdijk et al, 2014). L'absence d'effet vieillissement sur la prolifération en culture cellulaire confirme l'importance de l'environnement musculaire dans les capacités de régénération de ces cellules satellites âgées. Pour preuve, cette absence de différence n'est observée que sur des cultures cellulaires utilisant un milieu à base de sérum foetal de veau tandis qu'avec du sérum humain du même âge on observe une réponse tardive aux stimuli d'activation et une prolifération réduite (Barberi et al, 2013).

L'ensemble des ces données laissent penser que les modifications de fonctionnalité des cellules satellites observables dans le muscle âgé sont d'origine intrinsèque mais aussi extrinsèque. De plus, tout porte à croire que l'implication de ces cellules dans la sarcopénie est indirecte. Le processus de vieillissement, par le biais des cellules satellites, engendre une baisse significative des capacités de régénération musculaire. Ceci n'écarte pas les cellules satellites du processus conduisant à la sarcopénie mais leur confèrent un rôle discontinu.

***Un ensemble de changements intrinsèques ou extrinsèques à la cellule musculaire âgée expliquent le développement de la sarcopénie. Il est particulièrement intéressant de noter la résistance aux stimuli anaboliques en partie expliquée par une dysfonction mitochondriale. De plus, les stimulations nerveuses perçues par le muscle sont altérées aboutissant à des mécanismes intracellulaires atrophiques. Enfin, dans le cas d'une sollicitation contractile ou d'un trauma, il semble que la dysfonction des cellules satellites perturbe la régénération du muscle âgé. Dans ce contexte, la NRG1 en tant que facteur myogénique, neurotrophique et potentiellement inducteur de la biogénèse mitochondrial pourrait être une protéine d'un intérêt particulier.***

## **2.2.2 ROLE DE LA NRG1 DANS LA MYOGENESE ET LA REGENERATION DU MUSCLE SQUELETTIQUE.**

Le rôle crucial de la NRG1 dans la myogenèse et la régénération musculaire a été démontré depuis longtemps. D'une part, on peut distinguer un effet direct sur les processus myogéniques et régénératifs. D'autre part, la NRG1 peut agir de façon indirecte via le maintien de l'intégrité de la JNM et la survie des motoneurones.

### **2.2.2.1 ROLES DIRECTS SUR LA CELLULE MUSCULAIRE**

La NRG1 semble impliquée dans trois processus impliquant directement les cellules musculaires : la myogenèse, l'activation ainsi que la prolifération des cellules satellites et enfin l'hypertrophie liée à l'exercice.

#### **2.2.2.1.1 ROLE MYOGENIQUE**

Les cellules musculaires en culture expriment fortement et uniformément les récepteurs ErbB2 et ErbB3 durant la myogenèse (Kim et al, 1999 ; Ricci et al, 2000). A l'inverse, dans les cellules musculaires différenciées, il a été montré une concentration des ErbB2 et ErbB4 au niveau des jonctions neuromusculaires (Trinidad et al, 2000). Deux équipes ont suggéré un rôle initiateur de la différenciation sur des myotubes de rat de type L6 (Florini et al, 1996 ; Kim et al, 1999). Il a été montré que la NRG1 libérée par ces cellules se fixe de manière autocrine sur son récepteur ErbB3 (Kim et al, 1999). Cette fixation se révèle, par ailleurs, essentielle pour leur différenciation myogénique. De plus, la NRG1 agit de manière additive avec l'IGF-1 (Insulin Like Growth Factor) probablement du fait de différences de signalisation au stade précoce de la myogenèse (Florini et al, 1996). A contrario, Ford et al. ont démontré que la NRG1 est un puissant mitogénique dans les myoblastes de rat de type L6 (Ford et al, 2003), mais elle inhiberait la différenciation myogénique en bloquant l'expression de la myogénine. Ces effets mitogéniques ou myogéniques de la NRG1 semblent dépendants des concentrations utilisées (Ford et al, 2003).

Cependant, l'ensemble de ces études a utilisé un modèle de culture cellulaire *in vitro*. Ce modèle ne reflète donc pas nécessairement les changements adaptatifs dans les cellules *in vivo* durant la régénération musculaire. Dans le tissu musculaire différencié seules les cellules satellites montrent encore un processus myogénique.

#### 2.2.2.1.2 NRG1 ET CELLULES SATELLITES

Le rôle de la NRG1 durant la régénération musculaire semble se centrer essentiellement sur la physiologie des cellules satellites.

*In vitro*, la myogenèse de cellules L6 ou C2C12 se termine en fin de compte par la formation de myotubes mais pas de fibres musculaires à proprement parler. Dans un modèle de régénération musculaire *in vivo* les cellules satellites quiescentes migrent vers le site atteint où elles prolifèrent, se différencient et fusionnent avec les fibres endommagées pour former de nouvelles fibres (Hawke et al, 2001). Dans ce contexte, un modèle de souris KO pour le récepteur ErbB2 a montré l'importance de son rôle anti-apoptotique pour la survie des myoblastes durant la différenciation (Andrechek et al, 2002). Un modèle *in vitro* a confirmé le rôle essentiel d'ErbB2 durant les 24h premières heures d'activation des cellules satellites (Golding et al, 2007). De plus, l'injection de bupivacaine, un anesthésique myotoxique/neurotoxique, augmente la présence de NRG1 à la fois dans les cellules satellites et les motoneurones (Hirata et al, 2007).

Les cellules satellites ne sont cependant pas activées uniquement en réponse à un processus traumatique majeur. On observe également leur activation lors de la pratique d'un exercice physique, particulièrement si c'est un exercice de renforcement musculaire (Kadi et al, 2004) et ce même chez la personne âgée (Nederveen et al, 2015).

#### 2.2.2.1.3 NRG1 ET HYPERTROPHIE CONSECUTIVE A L'EXERCICE PHYSIQUE

Lors d'un protocole d'électrostimulation réalisé chez des rats, il a été observé une phosphorylation du récepteur ErbB3 (Lebrasseur et al, 2003) et, suite à un entraînement chronique chez l'homme, il a été observé une augmentation de sa quantité (Lebrasseur et al, 2005). Or, le récepteur ErbB3 possède six sites de liaison à PI3K (Hellyer et al, 1998) et l'importance de cette voie (PI3K/Akt) dans la régulation du trophisme musculaire est bien connue (Rommel et al, 2001 ; Stitt et al, 2004). ErbB3 constitue donc un acteur potentiellement impliqué dans les effets hypertrophiques de l'exercice physique. Par ailleurs, la NRG1 augmente la synthèse des protéines dans des myotubes C2C12 (30%) ainsi que dans le diaphragme de rat (40%) ce qui semble confirmer son potentiel hypertrophique (Hellyer et al, 2006).

A noté que les rats utilisés dans cette étude n'étaient âgés que de 3 jours. En parallèle des facteurs myogéniques directs, il a été observé depuis longtemps que les nerfs ont la capacité de maintenir l'intégrité ou de stimuler la croissance du muscle squelettique (Gutmann 1976). Or, la NRG1 possède des propriétés neurotrophiques démontrées (Peles et Yarden, 1993).

#### **2.2.2.2 NRG1 ET MAINTIEN DE LA FONCTIONNALITE NEUROMUSCULAIRE**

La NRG1 possède la capacité d'agir sur la formation et le maintien de la JNM mais aussi sur la survie des motoneurones. Ce faisant, elle participe à une communication neuromusculaire optimale.

##### **2.2.2.2.1 NRG1 ET JONCTION NEUROMUSCULAIRE**

La NRG1 est connue pour son rôle dans la formation de la JNM (Rimer et al, 1998) ce qui lui a valu initialement le nom d'ARIA (Acetylcholine Receptor Inducing Activity). Lors de la primo-innervation de la fibre musculaire, on observe une accumulation de NRG1 d'origine nerveuse au niveau de la lame basale via la fixation aux protéoglycans et à l'agrine (Meier et al, 1998 ; Rimer et al, 1998). La stimulation électrique, quant à elle, favorise la formation de la JNM via la voie ADAM19/NGR1/ErbB3 (Fukazawa et al, 2013). Par ailleurs, dans les cellules de Schwann, il a été montré que l'activation expérimentale d'ErbB2 induit un profil d'expression génique similaire à celui observé durant une dénervation (Heyworth et al, 2006). De plus, la régénération de la jonction neuromusculaire est imparfaite chez des souris KO conditionnel pour la NRG1 dans les motoneurones (Fricke et al, 2011).

L'action de la NRG1 permet l'expression d'un grand nombre de protéines de la JNM et parmi celles-ci, l'utrophine (Gramolini et al, 1999). Cette protéine est structurellement jumelle de la dystrophine et suggère donc un rôle pour la NRG1 dans les dystrophinopathies telle que la maladie de Duchenne (DMD). A ce titre, un traitement avec de la NRG1 a été testé sur des souris mdx, modèle animal imparfait de la DMD, et a permis une amélioration de la force ainsi que des paramètres histopathologiques (Krag et al, 2004). Handschin et Spiegler ont décrypté le mécanisme d'action de la NRG1 et trouvent une stimulation de PPAR $\gamma$  (peroxysome proliferator activated receptor), PGC-1 $\alpha$  (co-activator 1 $\alpha$ ) et GABP (GA binding protein). Cela permet le recrutement de PGC-1 $\alpha$  par le complexe GA (NRF2 pour

l'humain) et induit ainsi la transcription des gènes codant pour les protéines de la JNM (Handschin et Spiegelman, 2006). Suite à ce travail, l'équipe a mis en place une surexpression de PGC-1 $\alpha$  chez la souris mdx, ce qui améliore également les paramètres caractéristiques de la DMD, confirmant ainsi les premiers résultats (Handschin et al, 2007). On retrouve des bénéfices sur l'histologie musculaire, la performance motrice, et les taux de créatine kinase plasmatiques. A noter que le facteur PGC-1 $\alpha$  inhibe également la transcription des gènes de l'atrophie musculaire induite par le facteur nucléaire FoxO3 (Sandri et al, 2006) et est impliqué dans la biogénèse mitochondriale du muscle squelettique (Wu et al, 1999 ; Li et al, 2002).

La NRG1 semble également capable d'agir en amont de la jonction neuromusculaire directement sur les motoneurones et leur gaine de myéline, notamment durant un processus régénératif.

#### 2.2.2.2.2 NRG1 ET MOTONEURONE

Hirata et al. (2007), dans leur étude utilisant de la bupivacaine, ont observé une absence d'augmentation des ARNm de NRG1 dans les motoneurones malgré une hausse concomitante de la protéine (Hirata et al, 2007). Ce résultat suggère un transport rétrograde de la NRG1 depuis les cellules musculaires. Ce phénomène a déjà été montré pour d'autres facteurs neurotrophiques (Leitner et al, 1999). Or, l'injection de bupivacaine détériore également les JNM (Hirata et al, 2007). Les auteurs suggèrent alors que la NRG1 pourrait constituer un facteur aigu de régénération de la plaque motrice secrétée par la cellule musculaire en situation de stress. Ainsi, la NRG1 pourrait donc participer au maintien ou à la régénération de l'intégrité musculaire par le biais de ses effets sur le système nerveux. De plus, la NRG1 est aussi capable d'inhiber l'apoptose des motoneurones (Ricart et al, 2006) ce qui laisse présager un rôle thérapeutique dans certaines pathologies neurodégénératives (Song et al, 2012). La sarcopénie a notamment été suggérée comme potentielle cible (Lynch, 2008) compte tenu du rôle de l'apoptose neuronale dans la fonte musculaire liée à l'âge (Ryall et al, 2008).

Enfin, la NRG1 est également impliquée dans la formation de la gaine de myéline à partir de la membrane plasmique des cellules de Schwann, dans le système nerveux périphérique, et des oligodendrocytes, et dans le système nerveux central (Garratt et al, 2000 ; Nave et al, 2006). Ces données suggèrent de potentiels usages

thérapeutiques pour des pathologies de démyélinisation comme la sclérose en plaques (SEP). Ces pathologies sont d'ailleurs caractérisées par une importante atrophie musculaire (Wens et al, 2014). Un traitement par la NRG1 a donc été testé et a permis d'induire une remyélinisation et était associée à une augmentation de l'IL10 (Cannella et al, 1998 ; Marchionni et al, 1999).

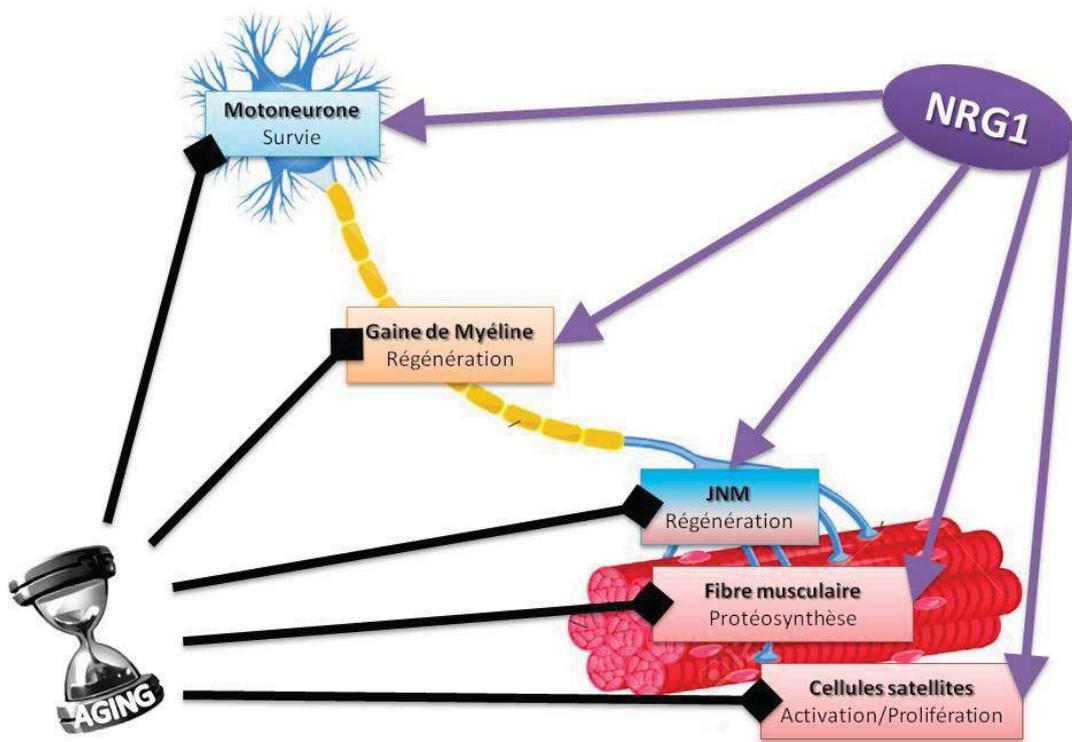


FIGURE 21: SCHEMA RECAPITULATIF DES ROLES DE LA NRG1 SUR LE TISSU MUSCULAIRE ET MISE EN PERSPECTIVE AVEC LES ALTERATIONS LIEES AU VIEILLISSEMENT.

***La NRG1 possède un rôle myogénique direct transposable à la fonctionnalité des cellules satellites et pourrait même prendre part aux effets hypertrophiques de l'exercice physique par le biais de son récepteur ErbB3. D'un autre côté, la NRG1 est fortement impliquée dans la physiologie de l'interface nerf-muscle. En effet, elle agit sur trois éléments essentiels que sont la JNM, la gaine de myéline et la survie des motoneurones. On retrouve à nouveau un rôle important des voies de signalisation liées à la mitochondrie dans ces propriétés.***

### 2.2.3 SYNTHÈSE ET PERSPECTIVES

Il a été évoqué, dans les parties précédentes, un certain nombre de facteurs intrinsèques ou extrinsèques à la cellule musculaire, à l'origine du phénomène de sarcopénie. Le faisceau d'indices qui a été mis en avant semble montrer que l'atrophie musculaire ne s'installe pas de manière continue et progressive. Au contraire, on observe une incapacité de la cellule musculaire à répondre aux stimuli environnementaux, tels que l'exercice physique, l'insuline, les acides aminés ou un traumatisme.

La NRG1 est capable d'agir sur la plupart des facteurs étiologiques de la sarcopénie qui ont été présentés. Parmi ceux-ci, son rôle dans le métabolisme énergétique (Guma et al, 2010), largement évoqué en amont, participerait à son importance dans la régulation de la balance protéique (Hellyer et al, 2006). De plus, la NRG1 est un facteur neurotrophique et myogénique impliqué dans les processus de régénération musculaire et nerveux (Hirata et al, 2007). Malgré cela, aucune étude n'a porté sur la NRG1 dans un contexte de vieillissement musculaire. De plus, l'altération de la capacité de réponse anabolique ou régénérative de la cellule musculaire âgée pose la question de la fonctionnalité de facteurs de croissance comme la NRG1.

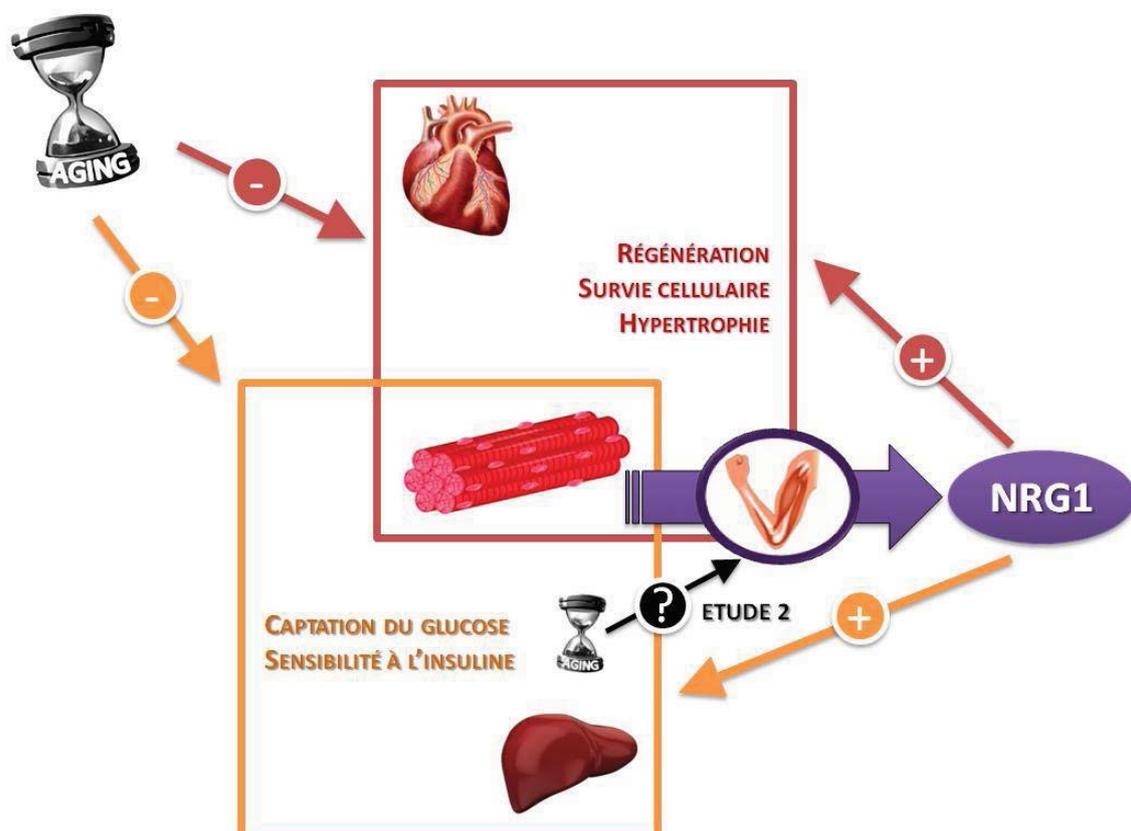
En effet, une altération de la voie de la NRG1 au sein du muscle âgé pourrait constituer l'un des éléments à l'origine de l'atrophie musculaire.

Des données de la littérature ont montré une libération de NRG1 lors d'un exercice physique, ainsi que sa participation potentielle aux effets d'un entraînement chronique (Lebrasseur et al, 2003 ; Lebrasseur et al, 2005). L'exercice physique étant une des contre-mesures de la sarcopénie, il pourrait constituer un contexte physiologique propice à l'investigation de la fonctionnalité de cette voie dans le cadre du vieillissement.

Notre équipe s'est intéressée à l'impact de l'exercice chronique dans un contexte d'obésité (Ennequin et al, 2015b). Ceci mis à part, les études réalisées sur la NRG1 et l'exercice aigue *in vivo* n'ont été réalisés que par une seule équipe et n'ont jamais été reproduites depuis. De plus, aucune donnée sur l'impact du vieillissement n'est à l'heure actuelle publiée.

L'objet de la deuxième étude sera donc d'explorer l'impact de l'exercice aigue et d'y adjoindre le contexte du vieillissement.

- L'impact de l'exercice aigue précédemment observé est il reproductible et quel est la signalétique cellulaire engendrée ?
- Quel est l'impact du vieillissement sur la voie NRG1/ErbB au niveau musculaire ?
- Quel est l'effet du vieillissement sur l'activation de la voie NRG1/ErbB lors de la réalisation d'un exercice aigue ?



*Dans les parties précédentes, le recoupement entre voie NRG1/ErbB et âge a été développé dans les champs de l'homéostasie glucidique et de la fonction musculaire. Cette troisième partie sera consacrée à l'impact du vieillissement sur le tissu cardiaque et aux rôles potentiels de la NRG1 dans ce contexte.*

## **2.3 NRG1, VIEILLISSEMENT ET FONCTION CARDIAQUE**

Les statistiques de l'American Heart Association, basées sur les données du National Center for Health Statistics (NCHS) et du National Heart, Lung and Blood Institute en 2010, ont montré que la prévalence de l'hypertension artérielle, des accidents vasculaires cérébraux, des maladies coronariennes et enfin de l'insuffisance cardiaque augmentent de façon spectaculaire avec l'âge chez les hommes comme chez les femmes (Roger et al, 2011). En outre, les plus de 60 ans représentent plus de 80% des patients atteints de maladie coronarienne, plus de 75% des patients souffrant d'insuffisance cardiaque congestive, et plus de 70% des patients atteints de fibrillation auriculaire.

La NRG1, quant à elle, est indispensable au développement cardiaque et stimule un grand nombre de cascades de signalisation intracellulaires dans les cardiomyocytes. Il n'est donc pas surprenant que l'administration de NRG1 présente un intérêt clinique grandissant dans le champ des pathologies cardiovasculaires. En témoignent les articles et revues de synthèse qui ont été publiés récemment dans de prestigieuses revues internationales (Yutzey 2015 ; Parodi et Kuhn, 2014). De plus, Clinical-Trials.gov recense actuellement 8 études cliniques en cours sur l'insuffisance cardiaque et deux sont d'ores et déjà terminées et publiées (Jabbour et al, 2011 ; Gao et al, 2010).

Malgré ces indices convergents, le rôle de la NRG1 dans le vieillissement cardiaque n'est évoqué que dans une seule publication (Rohrbach, Niemann et al, 2006). Compte tenu du rôle majeur du processus de vieillissement dans l'apparition d'un dysfonctionnement cardiaque, il apparaît essentiel de connaître la fonctionnalité de la NRG1 dans le cœur âgé.

### **2.3.1 VIEILLISSEMENT DE LA FONCTION CARDIAQUE**

Les changements cardiaques, observés chez la personne âgée, sont à la fois structurels et fonctionnels. Ils découlent d'une altération des processus de cardioprotection ainsi que de régénération, et de très nombreux processus systémiques, organiques, tissulaires et cellulaires sont à l'œuvre.

La synthèse qui va suivre ne pourra donc être exhaustive. L'objectif est de présenter les différentes atteintes permettant une compréhension du potentiel thérapeutique de la NRG1. Les données présenteront une vue d'ensemble des altérations observables en clinique puis seront mis en exergue les facteurs intrinsèques au cardiomyocyte ainsi que les facteurs extrinsèques (vascularisation, système nerveux autonome).

#### **2.3.1.1 VIEILLISSEMENT ET ATTEINTE FONCTIONNELLE CARDIAQUE GLOBALE**

De profonds changements structuraux et fonctionnels cardiaques apparaissent avec le vieillissement et chacun de ceux-ci a des implications dans l'éthiopathogénie des maladies cardiovasculaires. Structurellement, il y a une augmentation significative de l'épaisseur du myocarde (Gerstenblith et al, 1977) en raison de l'augmentation de la taille des cardiomyocytes (Olivetti et al, 1991). De plus, le cœur initialement de forme elliptique devient sphéroïde avec une hypertrophie asymétrique privilégiant le septum inter-ventriculaire plutôt que la paroi cardiaque (Hees et al, 2002). Ces changements dans l'épaisseur et la forme ont des implications importantes dans l'efficacité globale de la contraction. Il existe également une augmentation de la prévalence de l'hypertrophie ventriculaire gauche (HVG) avec l'âge et ce même en l'absence d'une hypertension artérielle qui en est le facteur de risque causal le plus courant (Lakatta et Levy 2003). L'échocardiographie doppler est progressivement altérée avec l'âge dans les deux sexes avec pour causes probables la fibrose, le manque d'élasticité du ventricule et un retard de relaxation ventriculaire (Levy et Lakatta., 2003).

Malgré ces modifications associées au vieillissement qui peuvent limiter la capacité fonctionnelle d'une personne et promouvoir une raideur vasculaire avec augmentation de la post-charge, la fonction systolique globale de repos du muscle cardiaque n'est pas modifiée par le vieillissement non pathologique (Fleg et al, 2014 ; Schulman et al, 1992). Cela ne veut pas dire pour autant qu'il n'y a pas de changement dans les composantes de la systole cardiaque. En fait, plusieurs changements se produisent dans la vitesse de raccourcissement et les interactions

du cœur avec le système vasculaire mais tout porte à croire qu'au repos ils s'équilibrent. A contrario, même au repos, le vieillissement impact sur la fonction diastolique. Le cœur se remplit de sang plus lentement chez les personnes âgées non pathologiques résultant en un volume télé-diastolique (VTD) inférieur (Gerstenblith et al, 1977; Miyatake et al, 1984; Bryg et al, 1987). Ce phénomène est principalement dû à une augmentation du temps de relaxation cardiaque. Au fil du temps, ce prolongement de la diastole va provoquer un élargissement auriculaire et l'atrium contribue progressivement à une plus grande partie du VTD. Les effets du vieillissement à l'exercice sont plus marqués. La diminution globale de la tolérance à l'exercice est bien illustrée par le déclin progressif de la  $VO_2\text{max}$  d'environ 10% par décade à partir de 20-30 ans (Fleg et al, 1988).

Ces modifications prennent leur source à la fois au sein de la cellule musculaire mais également via des facteurs de régulation de sa contractilité ou de sa perfusion.

### **2.3.1.2 FACTEURS INTRINSEQUES**

Dans la perspective d'étudier la fonctionnalité de la NRG1 dans le myocarde, il est particulièrement intéressant de donner quelques éléments sur les altérations du couplage excitation-contraction, le déficit régénératif et la hausse des processus apoptotiques.

#### **2.3.1.2.1 ALTERATION DU COUPLAGE EXCITATION-CONTRACTION CARDIAQUE**

Avec le vieillissement, un certain nombre de changements intracellulaires se produisent ayant pour conséquence un ralentissement des réactions qui contrôlent les battements cardiaques (Lakatta et Sollott, 2002 ; Janczewski et al, 2002). Les cinétiques de potentiel d'action, de transitoire calcique globale et le temps de contraction sont toutes prolongées (Sollott et al, 2002 ; Janczewski et al, 2002 ; Lakatta 2002). Ces observations expliquent une grande partie du déclin de la fréquence cardiaque maximale chez les personnes âgées pendant l'exercice.

L'expression et la fonctionnalité des protéines du couplage excitation-contraction (CEC) sont des éléments importants à l'origine de la dysfonction cardiaque observée avec l'âge (Feridooni et al, 2015). Comme observé dans l'insuffisance cardiaque congestive, il a été rapporté que la recapture du  $Ca^{2+}$  ainsi que son stockage, dans le réticulum sarcoplasmique (RS), sont diminués au cours du vieillissement cardiaque (Dai et al, 2009 ; Loffredo et al, 2014). La baisse de la recapture du  $Ca^{2+}$  pourrait être

expliquée par une diminution de la concentration des protéines SERCA (Dai et al, 2009). Des réactions d'oxydation ou de nitrosylation impliquant les protéines du CEC pourraient également altérer leur fonction. Ciblant les SERCA, ce phénomène réduit la phosphorylation du phospholamban, ralentissant ainsi la recapture du  $Ca^{2+}$  et si les récepteurs à la ryanodine (RYR) sont touchés, on observe alors des fuites et une diminution du stock calcique au sein du réticulum (Bers 2006 ; Miyamoto et al, 2000).

#### 2.3.1.2.2 CAPACITE DE REGENERATION CARDIAQUE

Certains chercheurs affirment que le taux de renouvellement des cardiomyocytes diminue progressivement avec le vieillissement. Cette diminution serait de 1% par an à partir de 25 ans puis 0,45% par an à partir de 75 ans (Bergmann et al, 2009). A contrario, Kajstura et al. (2010) ont trouvé que la régénération des cardiomyocytes était augmentée avec le vieillissement et restait importante tout au long de la vie (Kajstura et al, 2010). Cependant, ces cellules nouvellement générées semblent se dégrader rapidement chez les personnes âgées.

#### 2.3.1.2.3 APOPTOSE

L'augmentation de la mort des cardiomyocytes lors du vieillissement cardiaque est un trait commun avec certaines cardiomyopathies comme la cardiomyopathie ischémique dilatée ou la cardiomyopathie hypertensive (Nadal-Ginard et al, 2003). L'apoptose des cardiomyocytes perturbe la contractilité du myocarde et induit un remodelage ventriculaire, ce qui peut éventuellement entraîner une insuffisance cardiaque symptomatique (Foo et al, 2005). Le cœur figure parmi les organes à forte activité métabolique et est donc riche en mitochondries. Le cœur est donc particulièrement sensible aux dommages oxydatifs en cas de dysfonction mitochondriale. Phaneuf et Leeuwenburgh (2002) ont montré que le contenu cytosolique en cytochrome c était significativement plus élevé chez des rats de 16 et 24 mois par rapport aux animaux de 6 mois (Phaneuf et Leeuwenburgh 2002). En outre, la protéine Bcl-2, une protéine anti-apoptotique, a montré une forte tendance à diminuer avec l'âge, alors que Bax, une protéine pro-apoptotique, est restée inchangée. Le déficit d'apport énergétique en provenance de la mitochondrie est un autre élément potentiellement inducteur de l'apoptose (Ventura-Clapier et al, 2008). Cette insuffisance d'apport énergétique peut être expliquée par une inadéquation entre les besoins énergétiques et la biogenèse mitochondriale (Goffart et al, 2004), un découplage mitochondrial et/ou une moindre disponibilité en substrat (Murray et

al, 2004) ou encore une augmentation des altérations de l'ADN mitochondrial (Dai et al, 2011).

Outre le potentiel effet direct du vieillissement, il est probable qu'un déficit d'apport en oxygène et nutriments de même qu'une détérioration du contrôle nerveux engendre les altérations cellulaires précitées.

### **2.3.1.3 FACTEURS EXTRINSEQUES**

#### **2.3.1.3.1 SYSTEME NERVEUX AUTONOME**

Avec l'âge, il ya une diminution de la modulation autonome et notamment une « désensibilisation  $\beta$ -adrénergique » impactant la fréquence cardiaque, la contractilité du ventricule gauche et la pression artérielle télé-diastolique (Ehsani 1987 ; Scarpace et al, 1994). Durant le vieillissement, il ya une diminution des réponses cardiovasculaires lors d'une perfusion d'antagonistes des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques et une similitude dans le profil hémodynamique entre des sujets jeunes  $\beta$ -bloqués et des sujets âgés (Fleg et al, 1994). La réduction de la fréquence cardiaque maximale associée au vieillissement, même à des intensités d'exercice élevées et avec une augmentation des taux circulants de catécholamines, est donc directement associée à une sensibilité  $\beta$ -adrénergique réduite (Corbi et al, 2013a). De plus, le vieillissement est associé à une suractivation neuro-hormonale, caractérisée par des taux circulants élevés d'adrénaline et de noradrénaline. Ce phénomène est habituellement expliqué par la désensibilisation périphérique et une clairance plasmatique diminuée (Esler et al, 1995). La perte de sensibilité aux catécholamines est, au moins en partie, due à la réduction de la densité des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques au niveau de la membrane plasmique (White et al, 1994 ; Xiao et al, 1998).

Toutefois, les effets néfastes de la signalisation  $\beta$ -adrénergiques sur la santé cardiovasculaire sont à présent bien compris. Le rôle délétère de la signalisation  $\beta$ -adrénergique dans le vieillissement cardiaque a d'ailleurs été montré via l'adénylyle cyclase de type 5 (AC5- une enzyme impliquée dans la signalétique  $\beta$ -adrénergique). En effet, la perturbation du fonctionnement d'AC5 chez des souris protège contre l'hypertrophie cardiaque dépendante de l'âge ainsi que le dysfonctionnement systolique, l'apoptose, et la fibrose (Okumura et al, 2003; Okumura et al, 2007). Ce modèle présente également une durée de vie accrue.

#### 2.3.1.3.2 SYSTEME VASCULAIRE

Comme évoqué précédemment, des modifications apparaissent durant le vieillissement au niveau de la vascularisation cardiaque. Grâce à sa sécrétion d'oxyde nitrique (NO) et d'endothéline, l'endothélium est un régulateur puissant du tonus artériel. La dysfonction endothéliale a été identifiée dans un certain nombre de troubles cardiovasculaires, y compris l'hypertension, l'hypercholestérolémie et l'athérosclérose coronarienne et périphérique (Csiszar et al, 2008). Des études réalisées chez l'humain et l'animal ont révélé que le vieillissement est associé à une réduction de la vasodilatation dépendante de l'endothélium probablement secondaire à la biodisponibilité réduite en NO (Lakatta et al, 2003). Un certain nombre d'études sur les animaux ont montré que la production ainsi que les taux de NO (Tschudi et al, 1996) déclinent avec l'âge, probablement en raison d'une baisse du niveau de l'oxyde nitrique synthase endothéliale (eNOS) (Cernadas et al, 1998). Le déclin du flux sanguin coronarien subséquent est bien connu pour impacter négativement la survie des cardiomyocytes, principalement via le déficit en oxygène mais aussi en nutriments.

***Le cœur âgé subit, entre autre, une perturbation de sa stimulation  $\beta$ -adrénergique et de ses apports en oxygène ou en nutriments. Ces altérations participent probablement à la diminution des capacités régénératives des cardiomyocytes ainsi qu'à la hausse de leur apoptose. En parallèle, on observe une altération de la capacité de relaxation cardiaque dont l'une des origines est le ralentissement de la recapture du  $Ca^{2+}$  par le réticulum sarcoplasmique.***

***La NRG1 en tant que régulateur essentiel de la formation du myocarde, ainsi que du maintien de sa fonctionnalité, pourrait agir sur ces différentes fonctions physiologiques.***

## **2.3.2 NRG1 ET PHYSIOLOGIE CARDIAQUE**

La voie NRG1/ErbB est d'une importance capitale dans le développement et le maintien de la fonction cardiaque. Les nombreux modèles de souris transgéniques ont permis d'explorer ces questions en détails comme présenté précédemment dans ce document. Parallèlement à cela, l'étude du rôle de la NRG1 au niveau du muscle cardiaque adulte a été initiée fortuitement par l'observation des effets de certaines chimiothérapies adjuvantes ciblant le récepteur ErbB2 (Slamon et al, 2001). C'est notamment le cas du TASTUZUMAB (cancer du sein) qui a montré des effets cardiotoxiques préoccupant (Feldman et al, 2000).

Sur le cœur adulte, qui est notre thématique d'étude, la NRG1 a été largement étudiée et impacte positivement le système vasculaire où elle induit notamment l'angiogénèse. Cette partie ne sera pas développée plus avant dans ce document aussi j'invite le lecteur intéressé à consulter la revue de Hedhli et al. (2014).

### **2.3.2.1 EFFETS CELLULAIRES DE LA NRG1**

#### **2.3.2.1.1 MODE D'ACTION**

La fonctionnalité de la NRG1 au niveau cardiaque s'organise autour d'une interrelation paracrine entre cellules endothéliales et cardiomyocytes. En effet, la protéine transmembranaire Pro-NRG1 est produite puis transloquée à la membrane plasmique des cellules endothéliales puis le fragment bioactif est libéré dans l'espace intercellulaire et va se fixer sur les récepteurs ErbBs à la surface des cardiomyocytes (Cote et al, 2005).

#### **2.3.2.1.2 ROLE ANTI-APOPTOTIQUE**

Au niveau cellulaire, la NRG1 agit comme un puissant agent protecteur vis-à-vis de facteurs de stress extracellulaires. A titre d'exemple, l'activation de la voie PI3k/Akt, inhibant ainsi la libération du cytochrome c et l'activation de la caspase-3, permet à la NRG1 de protéger les cardiomyocytes de l'apoptose induite par le stress oxydant et les anthracyclines (Kuramochi et al, 2004 ; Fukazawa et al, 2003). Par ailleurs, sur des cardiomyocytes exposés aux anthracyclines, le blocage des récepteurs ErbBs induit un dysfonctionnement mitochondrial conduisant à une apoptose.

### 2.3.2.1.3 RÔLE DANS LA RÉGÉNÉRATION

Outre ces effets anti-apoptotiques, la NRG1 induit une prolifération cellulaire, permettant la régénération du tissu cardiaque (Bersell et al, 2009), et une hypertrophie médiée par la voie des MAPK et la protéine P70S6K (Baliga et al, 1999). A nouveau, sous l'exposition aux anthracyclines, la NRG1 a montré son rôle dans le maintien de l'intégrité structurelle des myofibrilles (sarcomère et cytosquelette) (Sawyer et al, 2002).

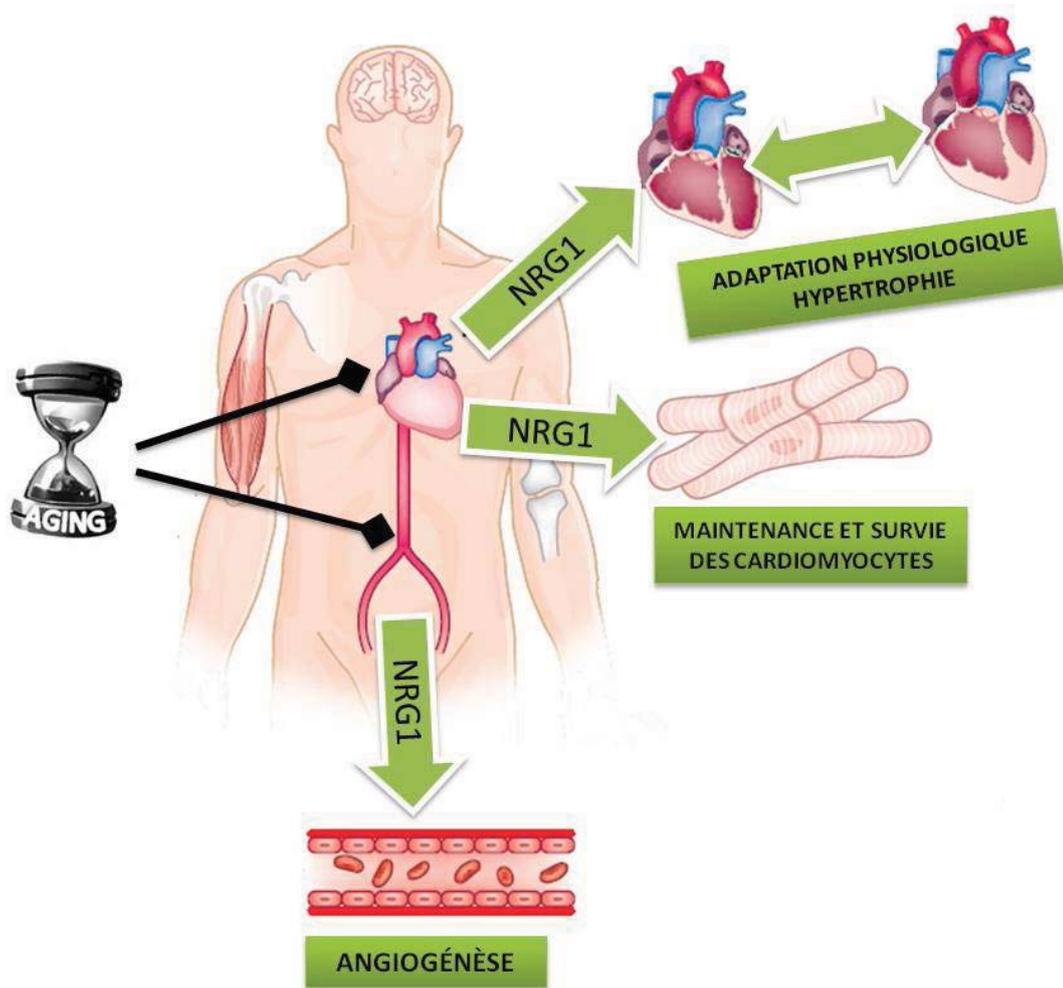


FIGURE 22: RÔLES DE LA VOIE NRG1/ERBB AU NIVEAU CARDIAQUE. MISE EN PERSPECTIVE AVEC L'EFFET DU VIEILLISSEMENT. (D'après Odiete et al. 2012)

#### 2.3.2.1.4 REGULATION DES PROCESSUS CONTRACTILES

Des études récentes ont permis d'approfondir notre compréhension du rôle de la NRG1 dans les mécanismes cellulaires de la contraction cardiaque. Il a été mis en exergue une implication dans la régulation de la balance sympathovagale ainsi que dans celle du couplage excitation-contraction.

##### **2.3.2.1.4.1 Inhibition de la réponse $\beta$ -adrénergique**

La NRG1 est capable d'atténuer l'effet inotrope positif de l'isoproterenol montrant ainsi une capacité de rétrocontrôle des perturbations induites par un stress cardiaque aigu ou une insuffisance cardiaque (Lemmens et al, 2004). Cet effet est permis par l'activation de l'enzyme eNOS (endothelial nitric oxide synthase) et la synthèse d'oxyde nitrique (NO) (Lemmens et al, 2004). La colocalisation des ErbBs et des eNOS au niveau des cavéoles membranaires potentialise cette voie et son effet anti-adrénergique (Zhao et al, 1999). En conséquence, il n'est pas surprenant d'observer une incapacité à contrecarrer une hyperactivité adrénergique chez des cardiomyocytes déficients en NRG1 (Okoshi et al, 2004).

##### **2.3.2.1.4.2 Accélération de la recapture du $Ca^{2+}$**

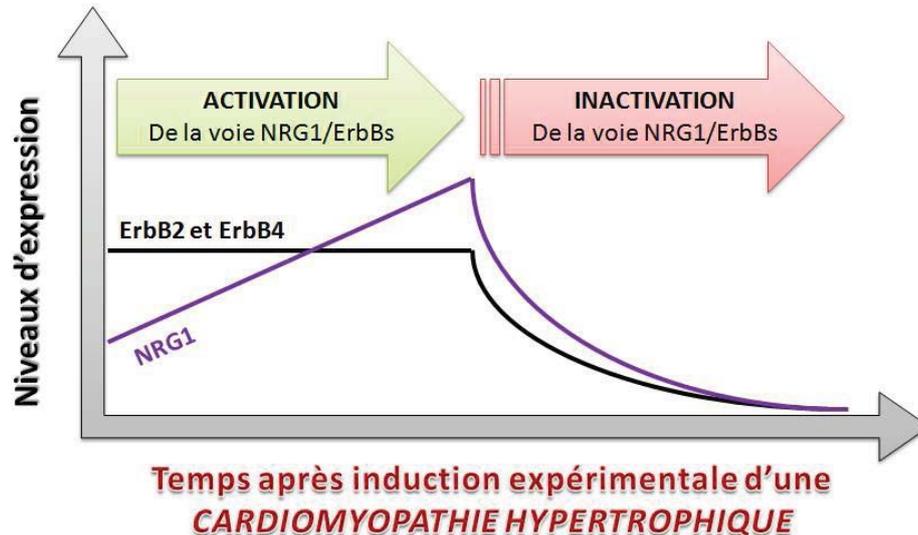
Brero et al. ont publié en 2010 une étude minutieuse du rôle de la NRG1 dans le couplage excitation-contraction cardiaque. Ils ont montré comment, via l'activation de la voie PI3K/Akt, la NRG1 induit la production de NO qui provoque alors l'activation de la protéine PKG et donc la phosphorylation du phospholamban. Ce mécanisme permet une levée d'inhibition de la pompe SERCA et ainsi une amélioration de la recapture du calcium pendant la diastole (Brero et al, 2010).

#### **2.3.2.2 IMPLICATIONS PHYSIOPATHOLOGIQUES**

Les modèles transgéniques et les études *in vitro* ont montré les nombreuses implications de la voie NRG1/ErbB dans la fonction cardiaque. Cependant, les études *in vivo* ont révélé un rôle plus intégrateur en physiologie et physiopathologie. En accord avec les résultats sur cultures cellulaires, la NRG1 ainsi que ses récepteurs ont un rôle protecteur vis-à-vis de la toxicité cardiaque de certaines chimiothérapies (Liu et al, 2005 ; Sawyer et al, 2002). Chez la souris, il est intéressant également de noter l'augmentation de la NRG1 associée à une augmentation de la phosphorylation d'ErbB4 durant l'hypertrophie cardiaque physiologique liée à la gestation (Lemmens et al, 2011).

A l'inverse de cette réponse positive lors d'un stress aigu, on observe une déficience d'activation du récepteur ErbB4 dans le ventricule droit de souris diabétiques de type 2 (Doggen et al, 2009). Cette désactivation des récepteurs semble altérer la relaxation du muscle cardiaque et, fait intéressant, cette perturbation est réversible par un traitement à la NRG1 tandis que l'insuline est inefficace. En accord avec ces résultats, l'expression et la phosphorylation d'ErbB2 et ErbB4 ainsi que l'expression de la NRG1 sont toutes abaissées chez un modèle de rat présentant une cardiomyopathie diabétique (Gui et al, 2012). De même, au stade final de la dysfonction ventriculaire induite par une sténose aortique, l'expression des ErbB2 et ErbB4 est diminuée (Rohrbach et al, 1999). C'est exactement l'inverse de la phase initial hypertrophique où l'on observe une up-régulation de la NRG1 comme lors de l'ischémie-reperfusion (Lemmens et al, 2006).

Collectivement ces données suggèrent un rôle protecteur et adaptatif de la NRG1 au sein du muscle cardiaque soumis à un stress aigu. Cependant, lorsque ce stress devient chronique, l'effet compensatoire de la voie NRG1 s'estomperait pour devenir l'un des facteurs d'aggravation de la pathologie cardiaque sous jacente (Figure 17).



**FIGURE 23: SCHEMA DE L'EVOLUTION DE LA SIGNALISATION NRG1/ERBB DURANT LE DEVELOPPEMENT D'UNE INSUFFISANCE CARDIAQUE. (D'après Lemmens et al, 2007)**

Durant la phase initiale du développement d'une dysfonction cardiaque, ou suite à un stress physiologique aigu (ischémie), le voie NRG1/ErbB est activé via l'expression et la libération accrue de NRG1. A l'inverse, lorsqu'une pathologie se développe de manière chronique, le protecteur de la voie s'estompe pour finalement devenir inférieure à la normale. Ce processus délétère se traduit par la diminution d'expression de la NRG1 et des ErbBs.

### **2.3.2.3 UTILISATION DE LA NRG1 EN PRATIQUE CLINIQUE**

En pratique clinique, deux utilisations possibles de la NRG1 ont été testées. D'une part le clivage de la NRG1 ou de ses récepteurs ErbB, permettrait un dosage plasmatique utilisable en tant que biomarqueur. Et d'autre part, la NRG1 pourrait constituer un traitement potentiel de l'insuffisance cardiaque.

#### **2.3.2.3.1 LA NRG1 COMME BIOMARQUEUR DE L'INSUFFISANCE CARDIAQUE**

Il a été montré une corrélation négative entre les taux de NRG1 et la sévérité de l'insuffisance cardiaque, le risque de transplantation ou même de décès (Ky et al, 2009). A l'inverse, la corrélation est positive en ce qui concerne les maladies coronariennes (Xu et al, 2009 ; Geisberg et al, 2011). L'utilisation du taux plasmatique de récepteur ErbB2 a d'ailleurs été suggérée comme marqueur positif de la sévérité de la maladie (Perik et al, 2007).

#### **2.3.2.3.2 LA NRG1 DANS LE TRAITEMENT DE L'INSUFFISANCE CARDIAQUE**

Le potentiel thérapeutique *in vivo* de la NRG1 a été exploré chez l'animal et des améliorations au niveau de la performance cardiaque, des biomarqueurs pathologiques et de la survie ont été démontrés (Li et al, 2011). Ces effets positifs ont été induits, entre autres, par une amélioration de la fonction mitochondriale (Guo et al, 2012), une diminution des dommages cellulaires (Liu et al, 2006) ou encore une réversion du remodelage ventriculaire (Gu et al, 2010). Compte tenu de ces résultats, des études cliniques (phase 2) ont été menées sur des patients présentant une insuffisance cardiaque stabilisée et ont montré des résultats encourageants (Gao et al, 2010 ; Jabbour et al, 2011). En 10 jours consécutifs, le traitement par NRG1 recombinante a permis d'améliorer la fonction ventriculaire gauche et cette amélioration était toujours significative 90 jours après la fin du traitement (Gao et al, 2010). Lors d'un autre essai clinique, utilisant également la durée de 10 jours, l'amélioration du débit cardiaque fut de 30% (Jabbour et al, 2011). D'autres études cliniques de plus grande ampleur (phase 3) sont actuellement en cours ou d'ores et déjà complétées afin d'évaluer l'effet de la NRG1 sur le risque de mortalité ou le remodelage du myocarde. Une étude de phase 1 bicentrique (Tennessee, Georgie) vient de se terminer et va permettre de déterminer l'efficacité de la NRG1 chez des patients souffrant d'une dysfonction ventriculaire gauche symptomatique.

### 2.3.3 SYNTHÈSE ET PERSPECTIVES

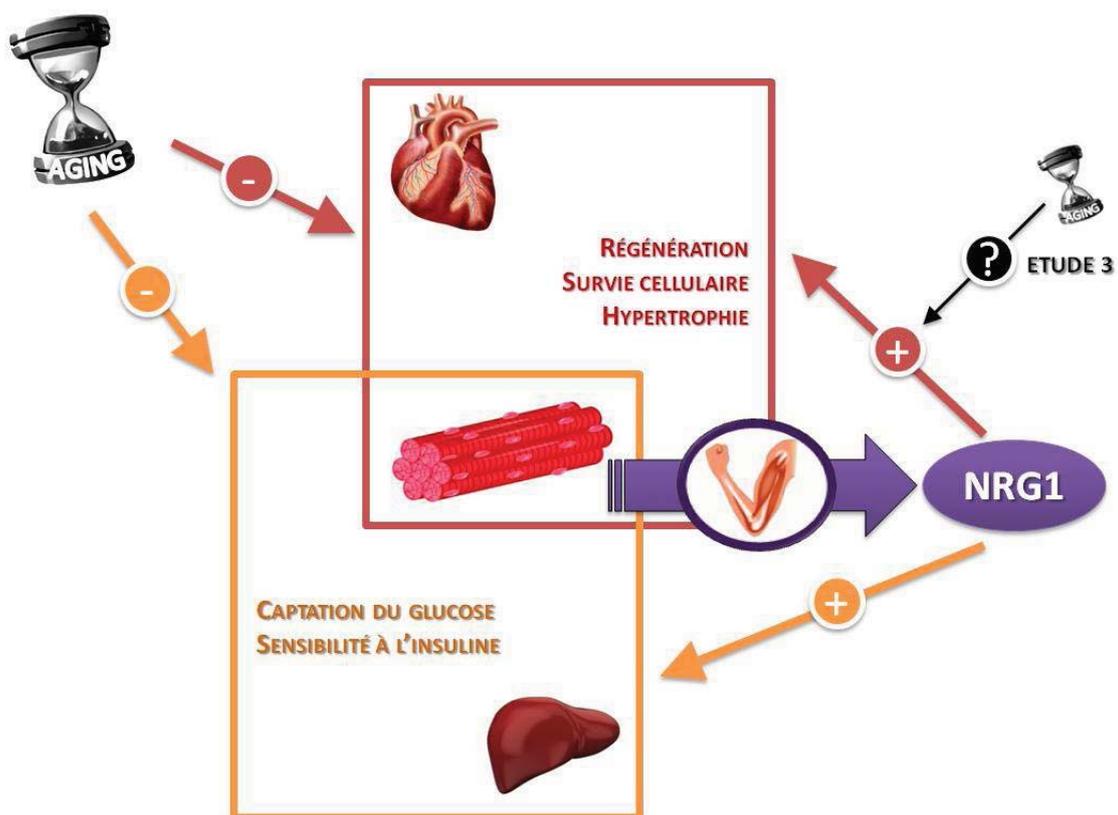
Chez l'homme tout comme chez l'animal, on observe de nombreuses détériorations de la fonction cardiaque. Ces perturbations ont pour origine les altérations du tissu cardiaque lui-même ou des ses tissus régulateurs connexes comme le lit vasculaire ou le système nerveux autonome. Or, les rôles de la NRG1 durant l'embryogénèse cardiaque, ainsi que les cardiomyopathies induites par des agents inhibiteurs de cette voie, ont conduit les chercheurs à explorer le lien entre pathologies cardiaques et NRG1.

Il s'avère que cette protéine possède de nombreuses fonctions de régulation dans le cœur adulte qui rappellent les altérations observées dans le cœur âgé. Ses rôles anti-apoptotique et régénératif notamment pourraient contrecarrer la hausse ou le déclin, respectivement, de ces fonctions cellulaires avec l'âge. Egalement, la capacité de la NRG1 à stimuler de la recapture du  $Ca^{2+}$  pourrait améliorer la relaxation du muscle cardiaque âgé. Une grande part des patients insuffisants cardiaques présenteront un âge avancé, la question de l'impact du vieillissement sur la réponse du cardiomyocyte à la NRG1 est donc essentielle pour une potentielle utilisation pharmacologique.

De surcroît, la voie de la NRG1 est activée puis inhibée durant le développement d'une insuffisance cardiaque ce qui pose la question de l'impact du vieillissement *per se* sur la fonctionnalité basale de cette voie.

L'objet de la troisième étude sera donc d'explorer l'impact du vieillissement sur la fonction de la voie au repos puis de déterminer la capacité de réponse à la NRG1 du cœur âgé.

- Quel est l'impact du vieillissement sur la voie NRG1/ErbB au niveau cardiaque?
- Quel est l'impact du vieillissement sur la réponse cellulaire cardiaque lors d'une injection de NRG1.



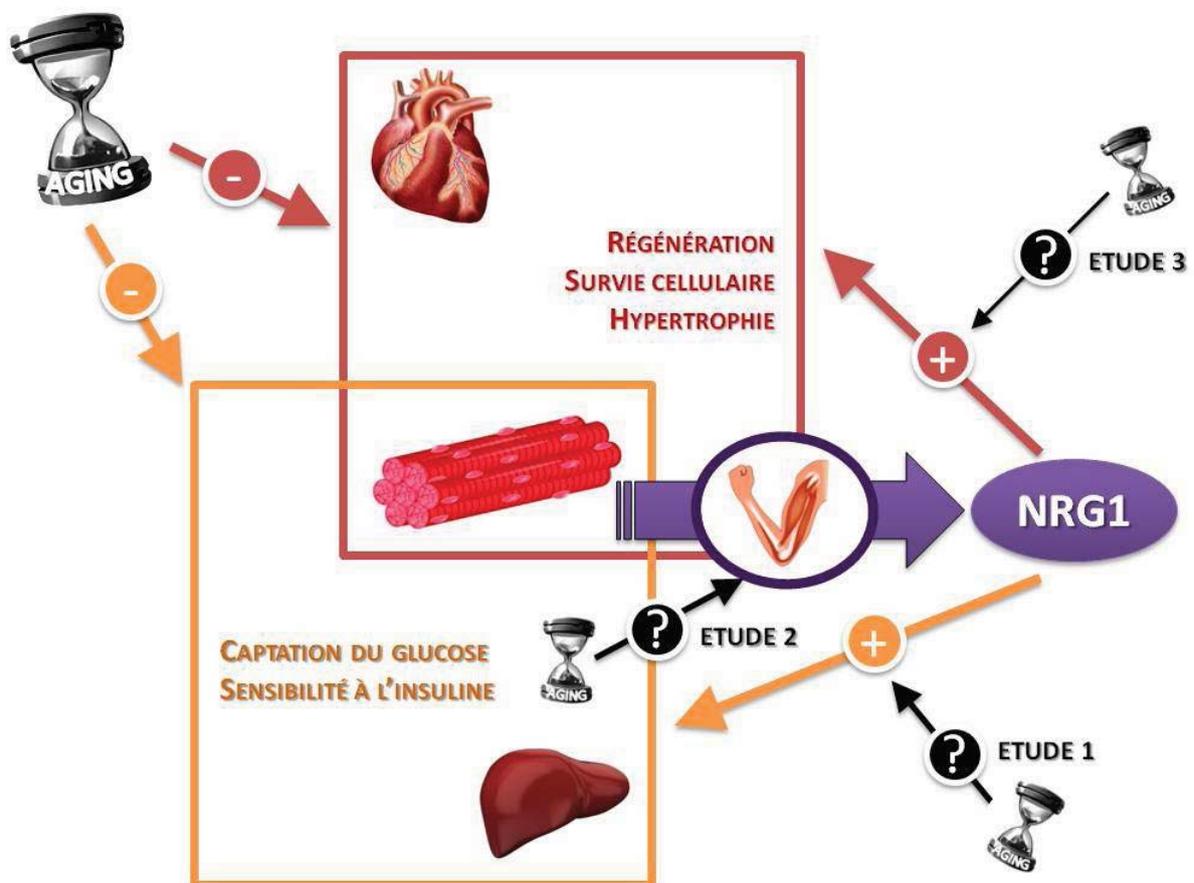
---

# OBJECTIFS

Le vieillissement est par essence un processus plurifactoriel et polyorganique, tout comme les rôles et fonctions de la NRG1. L'intolérance au glucose, les maladies cardiovasculaires et la sarcopénie représentent une grande part des dysfonctions observables chez la personne âgée.

L'originalité de ce travail de recherche était de replacer un processus physiopathologique, le vieillissement, et son potentiel traitement, la NRG1, au sein d'un tout.

Nous avons donc ciblé trois organes que sont le foie, le muscle et le cœur. En effet, ces organes sont en étroite interaction l'un avec l'autre, la dysfonction de l'un d'entre eux peut être cause ou conséquence de l'altération d'un des deux autres. Ceci est bien illustré par la prévalence des pathologies cardiovasculaires chez les diabétiques de type 2, les altérations musculaires chez les insuffisants cardiaques ou encore la part prise par la sarcopénie dans l'intolérance au glucose.



Les objectifs de cette thèse seront donc :

***Pour l'homéostasie du glucose (Etude 1)***

- De caractériser l'effet de la NRG1 sur l'homéostasie du glucose.  
Plus particulièrement lors d'un challenge glucidique qui révèle les premiers signes de perturbations avec l'âge.
- De définir le ou les organes impliqués dans l'effet de la NRG1.
- De définir les voies de signalisation impliquées.

***Pour la fonction musculaire (Etude 2 et 3)***

- De déterminer l'effet de la contraction du muscle squelettique *in vivo* sur la voie de signalisation de la NRG1.
- De définir l'effet du vieillissement sur l'activation de la voie NRG1/ErbB par la contraction musculaire.
- De déterminer l'effet du vieillissement sur la réponse du muscle cardiaque à la NRG1.

D'une part, nous émettons l'hypothèse que la NRG1 pourrait avoir un effet hypoglycémiant, probablement via la captation du glucose musculaire, et que le vieillissement impacterait négativement cet effet.

D'autre part, nous supposons que le vieillissement pourrait moduler la voie de la NRG1 au niveau du muscle, squelettique et/ou cardiaque, et notamment limiter la libération par clivage de la NRG1 lors d'un exercice physique.

---

# MATERIEL ET METHODES

# 1 ANIMAUX

Le modèle animal choisi dans ce projet de recherche est le rat de type wistar (CERJ Janvier, Le Genest Saint Isle, France). Ce phénotype albinos de *Rattus Norvegicus* est une espèce présentant naturellement une insulino-résistance et une intolérance au glucose avec l'âge (Gu et al, 2012 ; De Solis et al, 2012). Cette espèce a été largement utilisée dans des études sur la sarcopénie, l'immobilisation ou encore celles s'attachant aux effets de l'exercice physique (Mosoni et al, 2014 ; Magne et al, 2012 ; Bollheimer et al, 2012 ; Balage et al, 2010 ; Bar-Shai et al, 2005).

Il est relativement bien admis que des rats de 6 mois correspondent à un âge humain de 18-20 ans tandis que des rats de 22 mois correspondent à un âge humain approximatif de 58-60 ans (Sengupta 2013; Andreollo N et al, 2012; Quinn R 2005). Dans les études humaines traitant des perturbations métaboliques associées au vieillissement, comme la sarcopénie ou l'insulino-résistance, l'âge de recrutement est souvent plus de 60 ans (Exemple: Alexandre et al, 2014 ; Batsis et al, 2014 ; Liu et al, 2009 ; Batsis et al, 2013). En outre, l'Organisation mondiale de la Santé a historiquement adopté l'âge de 60 ans comme âge de référence à partir duquel une personne est considérée comme âgée<sup>4</sup>. Par conséquent, nous avons pensé que les âges de 6 et 22 mois seraient appropriés pour nos études.

L'entretien des animaux et les procédures expérimentales étaient en conformité avec la législation actuelle sur l'expérimentation animale et ont été approuvés par le comité local d'éthique pour l'expérimentation animale (Auvergne, C2EA-02). Les rats ont été maintenus à une température contrôlée (20- 22 ° C) et dans des cages au cycle lumière-obscurité inversé (20:00-8:00). Les rats avaient libre accès à l'eau.



---

<sup>4</sup> Site web de l'OMS: <http://www.who.int/healthinfo/survey/ageingdefnolder/en/>

## 2 EXPERIMENTATIONS *IN VIVO*

### 2.1 EXPLORATION DE LA TOLERANCE AU GLUCOSE

#### 2.1.1 OGTT

Les OGTT ont été réalisés sur deux semaines. Les rats (adultes et vieux) ont jeûné pendant la nuit (12h), puis ont reçu une solution saline (véhicule, VEH), ou l'injection de NRG1, 15 minutes avant que la charge de glucose soit administrée *per os* (2g.kg<sup>-1</sup> de poids corporel). La moitié des animaux a été choisie au hasard pour être traitée avec la NRG1 et l'autre moitié avec une solution saline au cours du premier OGTT. Chaque animal était son propre contrôle donc les rats traités avec la NRG1, lors de la première session, ont ensuite été injectés avec le VEH (solution saline) lors de la deuxième session. Ce fut l'inverse pour les rats traités avec le VEH lors de la première session. Ainsi, tous les animaux ont reçu une injection de NRG1 et une injection de solution saline.

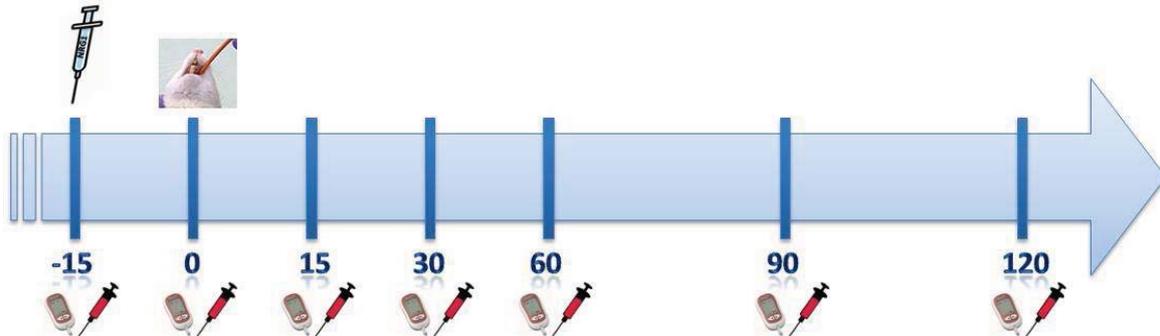


FIGURE 24: SCHEMA DU PROTOCOLE D'OGTT

## 2.1.2 MESURES METABOLIQUES

### 2.1.2.1 MESURE DU GLUCOSE SANGUIN

Les niveaux de glucose dans le sang ont été déterminés à l'aide d'un glucomètre 15 minutes avant le OGTT (-15), immédiatement avant la charge de glucose (0), puis après 15, 30, 60, 90 et 120 minutes (Accucheck Performa, ROCHE ; Figure 2).



FIGURE 25: GLUCOMETRE ACCUCHECK POUR LA MESURE DE GLYCEMIE

### 2.1.2.2 MESURE DE L'INSULINE

Durant chaque session, des échantillons de sang ont été prélevés dans la veine caudale à 15, 30, 60, 90 et 120 minutes après le gavage au glucose puis centrifugés à 6000 g pendant 5 minutes pour la collecte du plasma. Les échantillons de plasma ont été immédiatement congelés au moyen d'azote liquide puis stockés à -80°C jusqu'à utilisation ultérieure (sans rupture de la chaîne du froid).

L'insuline plasmatique a été mesurée avec un kit de dosage ELISA (ALPCO, USA, Seuil de détection : 0.15 à 20  $\mu\text{IU}\cdot\text{mL}^{-1}$ , Sensibilité : 0.135  $\mu\text{IU}/\text{mL}$ ).

### 2.1.2.3 ANALYSES DE MESURES METABOLIQUES

#### 2.1.2.3.1 CALCULS DES AIRES SOUS COURBES (AUC)

Les réponses glycémiques et insuliniques ont été exprimés en tant que i) l'aire sous la courbe (AUC), calculée en utilisant la méthode trapézoïdale (total AUC), et ii) l'AUC net, calculée après soustraction de l'air correspondant à la concentration de base.

#### 2.1.2.3.2 INDICE HOMA

L'indice HOMA, un marqueur de la résistance à l'insuline, a été calculé en utilisant la formule suivante: [insuline plasmatique à jeun ( $\text{mUI}\cdot\text{L}^{-1}$ ) x glycémie à jeun ( $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )] / 22,5.

### 2.1.2.3.3 INDICE DE RESISTANCE HEPATIQUE A L'INSULINE (HIRI)

Le produit de l'AUC net glycémie par l'AUC net pour l'insuline plasmatique au cours des premières 30 minutes du OGTT a été calculé et utilisé comme un indice de résistance à l'insuline hépatique (HIRI) (Abdul-Ghani et al, 2007 ; Figure14).

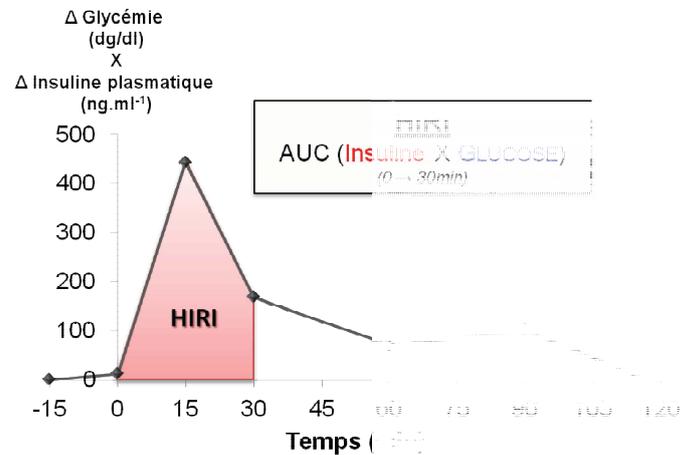


FIGURE 26: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'INDICE HEPATIQUE DE RESISTANCE A L'INSULINE (HIRI).

Exemple du rat 3-2 du groupe VEH

### 2.1.2.3.4 INDICE DE SENSIBILITE MUSCULAIRE A L'INSULINE (MISI)

La pente de la droite formée par l'évolution de la glycémie depuis sa valeur crête jusqu'à son nadir divisée par la concentration moyenne plasmatique d'insuline pendant le OGTT a également été calculée et utilisée comme un indice de sensibilité à l'insuline musculaire (MISI) (Abdul-Ghani et al, 2007 ; Figure15).

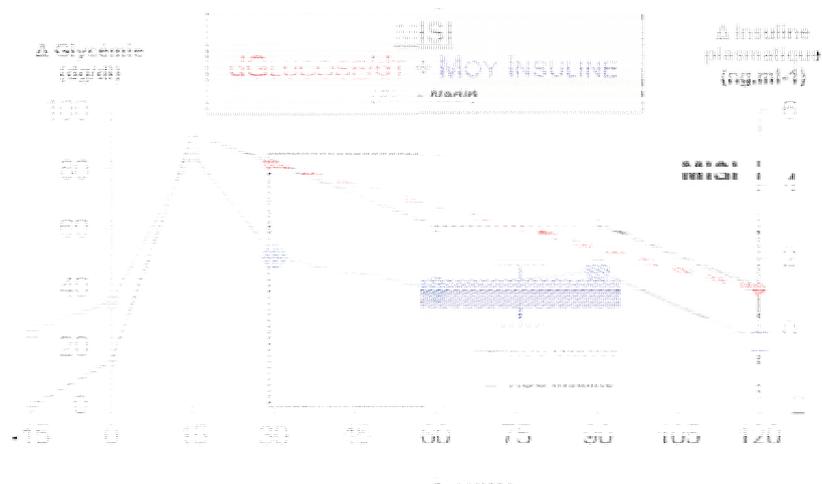


FIGURE 27:REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'INDICE MISI.

Exemple du rat 3-2 du groupe VEH

## 2.2 ELECTROSTIMULATION

La stimulation des muscles fléchisseurs plantaires, et plus particulièrement du gastrocnémien, a été effectuée *in vivo* sur un dynamomètre isocinétique spécialement conçu pour les rats (806D, Aurora scientifique, Canada).

Les rats ont été anesthésiés en continue par un dispositif inhalateur spécifiquement adapté délivrant de l'isoflurane à une concentration de 2%. Les animaux ont été placés en décubitus dorsal (Figure 28) sur une plaque chauffante avec le pied droit attaché à une platine connectée à un mode servomoteur double (305C-LR, Aurora scientifique, Canada). Le genou a été immobilisé de telle sorte que son angle était de 90 ° et l'axe de rotation de la cheville coïncide avec l'axe du moteur. Pour éviter toute variation de la température du corps, la température rectale a été surveillée et calculée par un régulateur de température (ATC 1000, World Precision Instruments, États-Unis) qui a ajusté la température de la plaque chauffante pour maintenir la température rectale à 37 ° C. La stimulation des muscles plantaires a été réalisée par voie percutanée par l'intermédiaire d'électrodes de surface (StimCom TS0020, COMEPA, France).

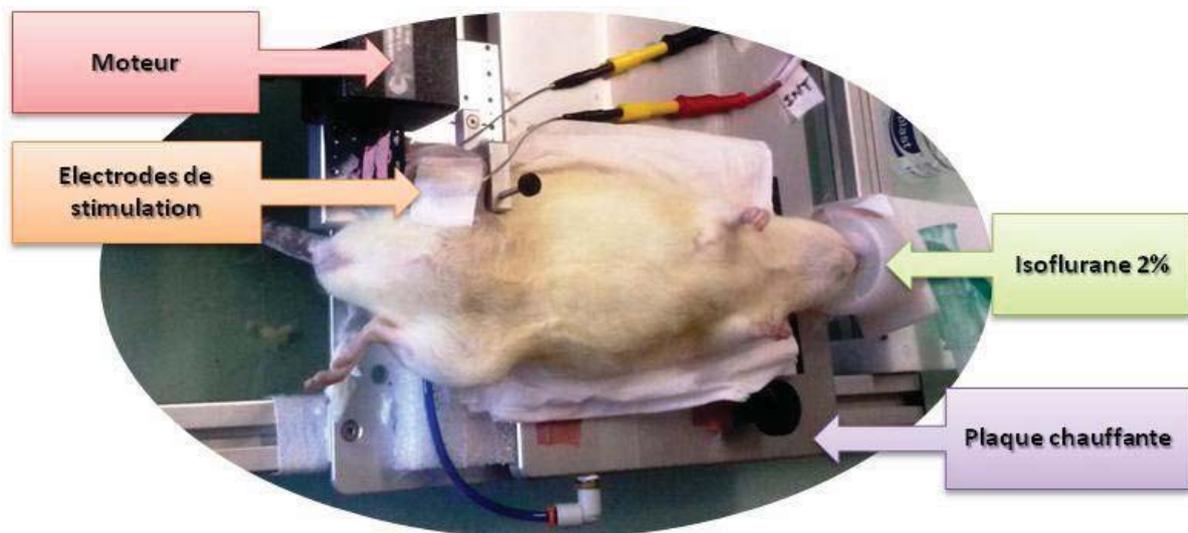


FIGURE 28: DISPOSITIF D'ELECTROSTIMULATION

Un stimulateur électrique à courant constant (DS 7A, Digitimer, Royaume-Uni) a été utilisé pour délivrer des ondes carrées (de largeur d'impulsion = 1 ms). Le stimulateur a été déclenché et contrôlé par des scripts automatisés par une carte A/D

(PowerLab 8/35, AD Instruments, Australie) et les logiciels associés (Lâchât 7.3, AD Instruments, Australie).

Ce dispositif a déjà été utilisé au laboratoire et a fait l'objet d'une publication dans le cadre de l'immobilisation (Martin et al, 2013).

Le protocole de stimulation consistait en 10 séries de 10 répétitions de 2s à 100Hz. Une récupération de 2s entre chaque répétition et de 1min entre chaque série était laissée à l'animal. Ce protocole a été adapté d'après l'étude de Matsuse et al. (2011) réalisée sur des sujets humains.

### 2.3 ESTIMATION DE LA COMPOSITION CORPORELLE

Le poids corporel et la consommation alimentaire ont été enregistrés toutes les semaines pendant le temps où les animaux ont été gardés à l'animalerie. La veille du sacrifice, la composition corporelle a été évaluée à l'aide d'un EchoMRI 3-en-1 (Echo Medical Systems, Houston, TX). Cet appareil, utilisant la technologie *d'absorption bi-photonique à rayons X*, a démontré une grande fiabilité et reproductibilité sur de petits animaux de laboratoires (Taicher et al, 2003).



FIGURE 29: APPAREIL DE MESURE DE LA COMPOSITION CORPORELLE

### **3 INJECTIONS DE NRG1 ET EUTHANASIE**

#### **3.1 LA NEUREGULINE-1**

Pour évaluer l'effet de NRG1, le domaine EGF (fragment bioactif) de la NRG1 humaine (isoforme  $\beta$ 2a; résidus Ser177 à Glu237) a été fourni par Zensun Science et Technologie Ltd (328 Bibo Road, Zhangjiang Science Park, Pudong, Shanghai 201203, Chine), dans une solution mère saline à  $1.25\text{mg.ml}^{-1}$ . Immédiatement avant l'I.V, cette dernière a été diluée avec une solution saline pour atteindre une solution injectable à  $50\ \mu\text{g.ml}^{-1}$  (concentration finale).

#### **3.2 INJECTION DE NRG1**

L'injection de NRG1 a été réalisée dans la veine caudale à une dose de  $1\text{ml.kg}^{-1}$  de solution soit  $50\ \mu\text{g.kg}^{-1}$  de NRG1. La dose injectée a été choisie à partir des travaux de Liu et al. (2006), mais réévaluée à la hausse du fait de la moindre expression de certains récepteurs au niveau du muscle squelettique ainsi que d'un effet supérieur sur la glycémie durant les pré-expérimentations. Cette opération a été réalisée par un technicien qualifié et expérimenté. Cette opération était réalisée soit avant l'OGTT, soit avant l'euthanasie.

#### **3.3 EUTHANASIE**

Les rats ont été anesthésiés avec du pentobarbital  $1\text{ml.kg}^{-1}$  (12h de jeûne au préalable) et euthanasiés par décapitation. L'euthanasie a été pratiquée soit immédiatement après le protocole d'électrostimulation, soit 30 minutes après l'injection de NRG1 ou de solution saline (VEH). Le cœur, le muscle gastrocnémien et le foie ont été disséqués et congelés immédiatement dans de l'azote liquide en vue des analyses biochimiques ultérieures.

Du sang a également été prélevé après décapitation, puis centrifugés à 6000 g pendant 5 minutes pour la collecte du plasma. Le plasma obtenu a été immédiatement congelé dans l'azote liquide pour une éventuelle utilisation ultérieure.

## **4 ANALYSES BIOCHIMIQUES**

### **4.1 EXTRACTION DES PROTEINES**

Les échantillons congelés (50mg) ont été broyés dans un broyeur de tissu Potter-Elvehjem placé dans de la glace avec 1 ml de tampon de lyse NP40 (50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl; 1% (v/v) Nonidet P-40; 1 mM EDTA; 5 mM pyrophosphate de sodium; 1 mM orthovanadate de sodium; 50 mM fluorure de sodium) auquel a été fraîchement ajouté un cocktail d'inhibiteurs de protéases et phosphatases commercial (Fischer Thermo Scientific). Les homogénats ont été centrifugés à 14 000 g pendant 10 min. Les surnageants ont été recueillis et stockés à -80°C.

### **4.2 DOSAGE DES PROTEINES**

La teneur en protéines du surnageant a été mesurée par la méthode de Bradford en utilisant un dosage colorimétrique (Laboratoires BioRad, Hercules, CA) et de la BSA comme standard à une concentration finale de 30  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  (Sigma-Aldrich Co., dilution avec tampon NP40).

### **4.3 WESTERN BLOT**

Les Western blot ont été réalisés pour mesurer l'expression des protéines dans les échantillons de foie, de gastrocnémien et de cœur.

#### **4.3.1 ELECTROPHORESE SDS-PAGE**

Les échantillons de protéines ont été dilués avec un tampon Laemmli et séparés en utilisant des Mini-Protean TGX Stain-Free gels (Laboratoires BioRad, Hercules, CA).

#### **4.3.2 TRANSFERT**

Le transfert a été réalisé sur des membranes de PVDF en utilisant un appareil de transfert transblot Turbo (Laboratoires BioRad, Hercules, CA).

### 4.3.3 IMMUNODETECTION

Les membranes ont été bloquées à température ambiante pendant 1 h avec une solution de BSA à 5% diluée dans une solution saline de Tris tamponnée (pH 7,5) contenant 0,1% de Tween 20 (TBST). Les membranes ont été incubées pendant une nuit à 4°C dans 5% de BSA avec des anticorps primaires.

	PROTEINE	MARQUE	DILUTION
<b>ETUDE 1</b>	ErbB1	<i>Santa Cruz</i>	1/500
	ErbB1-P (Tyr1173)	"	1/500
	ErbB2	"	1/200
	ErbB2-P (Tyr1248)	"	"
	ErbB3	"	"
	ErbB3-P (Tyr 1328)	"	"
	ErbB4	"	1/250
	ErbB4-P (Tyr 1056)	"	1/200
	AKT	<i>Cell Signaling</i>	1/1000
	AKT-P (Ser 473)	"	"
	p42/p44	"	"
	p42/p44-P (Thr202/Tyr204)	"	"
	PKCξ	"	"
	PKCξ-P (Thr410)	"	"
<b>ETUDE 2</b>	ErbB2	<i>Santa Cruz</i>	1/200
	ErbB2-P (Tyr1248)	"	"
	ErbB3	"	"
	ErbB3-P (Tyr 1328)	"	"
	ErbB4	"	1/250
	ErbB4-P (Tyr 1056)	"	"
	ADAM 17	<i>Abcam</i>	1/1000
	TIMP 3	<i>Santa Cruz</i>	1/1000
	Preseniline 1 et 2	<i>Cell Signaling</i>	1/2000
	PEN-2	"	"
	Nicastrin	"	"
	APH-1	"	"
<b>ETUDE 3</b>	ErbB1	<i>Santa Cruz</i>	1/500
	ErbB1-P (Tyr1173)	"	1/500
	ErbB2	"	1/200
	ErbB2-P (Tyr1248)	"	"
	ErbB3	<i>Cell Signaling</i>	"
	ErbB3-P (Tyr 1328)	"	"
	ErbB4	<i>Santa Cruz</i>	1/250
	ErbB4-P (Tyr 1056)	"	"
	AKT	<i>Cell Signaling</i>	1/1000
	AKT-P (Ser 473)	"	"
	p42/p44	"	"
	p42/p44-P (Thr202/Tyr204)	"	"
	ERRF11	Abclonal	1/1000
	TOB1	Assay Biotech	"
	TOB1-P	Assay Biotech	"
	Erbin	Santa Cruz	"
	EBP1	Bioss Antibodies	"

L'anticorps secondaire (couplé à la peroxydase de raifort) était ensuite dilué dans du TBST et appliqué pendant 1 heure à température ambiante. La révélation a été effectuée par chimiluminescence amplifiée (ECL) et des réactifs commerciaux ont été utilisés pour la détection du signal (Laboratoires BioRad, Hercules, CA).

#### **4.3.4 NUMERISATION ET NORMALISATION DES RESULTATS**

Des images numériques ont été acquises à l'aide du système d'imagerie moléculaire ChemiDoc XRS (Laboratoires BioRad, Hercules, CA). Les bandes ont été quantifiées à l'aide du logiciel Lab 4.1 Image (Laboratoires BioRad, Hercules, CA) et normalisées selon la méthode de normalisation totale des protéines (TPN) fournie par la technologie StainFree Blot (BIORAD ; Gilda et Gomes 2015).

La formulation de ce type de gel comprend un composé trihalogéné qui, lorsqu'il est exposé aux radiations UV, réagit et réalise une réaction covalente avec l'acide aminé tryptophane. Ainsi, les protéines présentes dans le gel émettent alors une fluorescence sous UV quantifiable avec le CHEMIDOC. Lorsque les protéines phosphorylées ont été quantifiées, nous avons d'abord normalisé les résultats à la teneur en protéines totales (mesurée grâce au stain free) avant le calcul du ratio de phosphorylation et le résultat était finalement exprimé relativement au contrôle.

## 5 STATISTIQUES

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel STATISTICA (version 8, USA). Les données sont présentées sous forme de moyennes  $\pm$  SEM.

Les comparaisons de moyennes entre 2 groupes (adultes vs vieux) ont été effectuées avec le test de Mann-Whitney. Après vérification de l'homogénéité de la variance avec le test de Bartlett, une analyse à deux voies de la variance a été utilisée pour étudier les effets de l'âge et du traitement à la NRG1 (quatre groupes : NRG1 ADULTE, NRG1 AGE, VEH ADULTE, VEH AGE).

Une ANOVA à mesures répétées a été effectuée en ajoutant un facteur temps pour les cinétiques de glucose et d'insuline. Lorsqu'une interaction entre plusieurs facteurs était significative, un test post-hoc de Tukey était réalisé pour comparer les groupes deux à deux. La significativité statistique a été fixée à 0.05.

---

**ÉTUDE 1 : LA NEUREGULINE DE TYPE 1  
AMELIORE LA TOLERANCE AU GLUCOSE CHEZ  
DES RATS ADULTES ET AGES.**

# 1 INTRODUCTION

La plupart des études sur la NRG1 ont mis l'accent sur son potentiel myogénique, ses propriétés neurotrophiques ou son rôle carcinogène. Récemment, il a toutefois été suggéré que la NRG1 pourrait également influencer sur le métabolisme du glucose (Guma et al, 2010) et ce en particulier dans le muscle squelettique, qui est principalement responsable de la captation glucose induite par l'insuline. En effet, la NRG1 semble augmenter l'absorption du glucose dans des myotubes L6E9 et dans le muscle soléaire *ex vivo* (Suarez al, 2001). En outre, l'exposition chronique à la NRG1 a amélioré la sensibilité à l'insuline *in vitro* dans des myocytes C2C12 et L6E9 (Canto al, 2007). A l'inverse, dans le foie, le principal organe impliqué dans l'homéostasie glycémique, l'insuline et la NRG1 semblent avoir des effets concurrentiels et non synergiques. En effet, dans le foie de rat, l'insuline diminue l'expression de la NRG1 et empêche la liaison à ses récepteurs via une voie dépendante de PI3K (Carver et al, 1996 ; Carver et al, 1997). De plus, chez des souris ob/ob donc obèses, la transactivation des ErbBs induit une résistance à l'insuline au niveau hépatique (Hemi et al, 2011). Par conséquent, la relation complexe entre la NRG1 et l'insuline dans ces organes soulève la question de son influence sur l'homéostasie du glucose à l'échelle systémique.

Parallèlement à cela, le vieillissement est un des états physiologiques couramment associé à une dépréciation de l'homéostasie du glucose (Paolisso et al, 1995). Une glycémie élevée à jeun et une résistance à l'insuline sont des perturbations courantes chez la personne âgée (De Fronzo 1979; De Fronzo 1981; Kohrt et al, 1993; Fink et al, 1983). Au niveau musculaire, les études portant sur le vieillissement révèlent une réduction de la captation du glucose insulino-dépendante concomitante d'une réduction de la translocation du transporteur GLUT4 vers la membrane sarcolemmale. Cette baisse est expliquée par une altération de l'ensemble la signalétique intracellulaire de l'insuline (Gardner et al, 2003 ; Maechler et al, 1999 ; Dokken et al, 2008 ; Maddux et al, 2001 ; Singh et al, 2008). De même, la suppression de la production hépatique de glucose par l'insuline est diminuée avec le vieillissement (Jackson et al, 1988) ce qui suggère une diminution de son efficacité (Freeman et al, 1973).

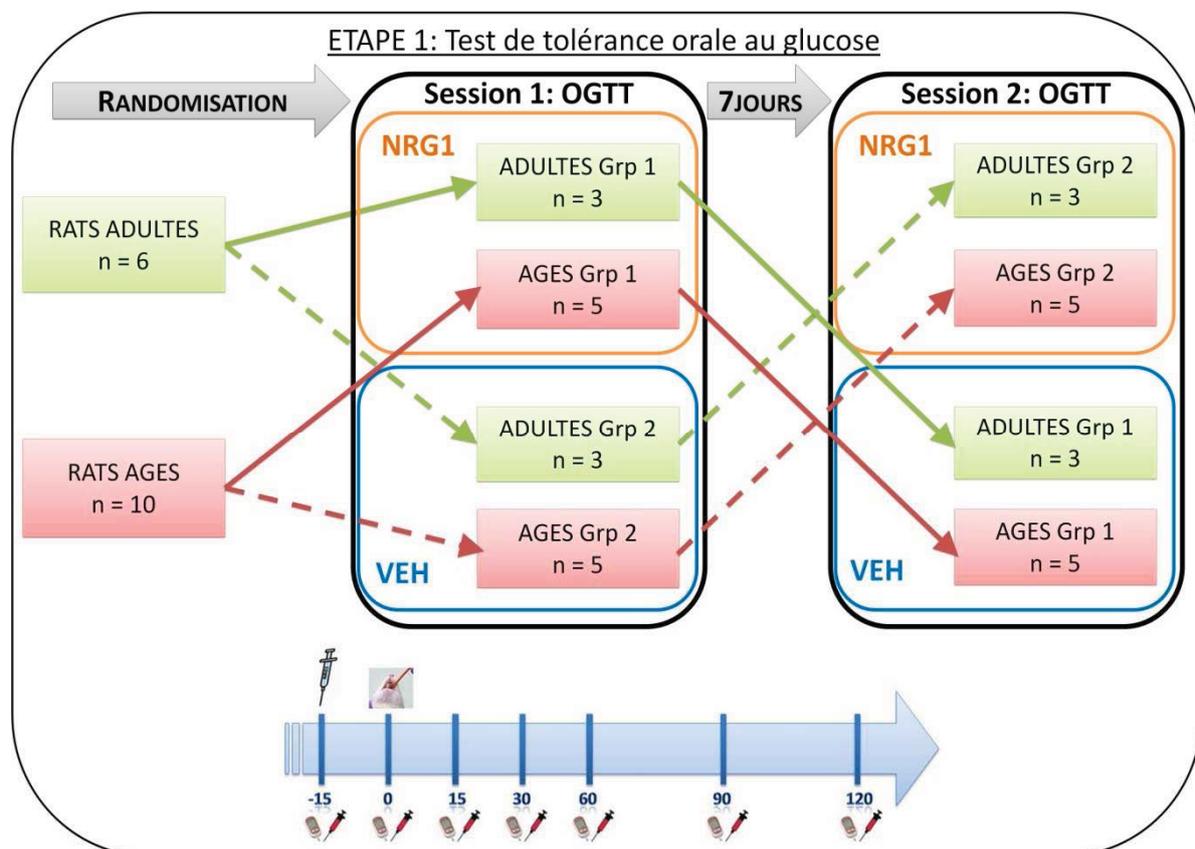
Or, la restauration de la voie NRG1/ErbB a été suggéré comme médiateur des effets positifs de la restriction calorique, une intervention connue pour améliorer l'homéostasie du glucose, la sensibilité à l'insuline et la durée de vie (Yamaza et al, 2002 ; Rohrbach et al, 2006). Par conséquent, la voie de signalisation NRG1/ErbB pourrait être impliquée dans les déficiences métaboliques liées à l'âge.

Le but de cette étude était de déterminer si l'administration de NRG1 en aiguë peut affecter l'homéostasie glycémique chez des rats adultes et âgés. Nous avons supposé que la NRG1 aurait un effet hypoglycémiant systémique et que cet effet serait différentiellement affecté par l'âge. Pour tester cette hypothèse, nous avons étudié les effets de l'administration de NRG1 par injection intraveineuse (iv) sur la glycémie et l'insulinémie durant un test de tolérance oral au glucose (OGTT) chez des rats adultes et âgés. Nous avons également évalué la signalisation NRG1/ErbB dans le foie et le muscle squelettique consécutivement à l'administration de NRG1 en aiguë afin d'explorer les mécanismes impliqués dans les effets de la NRG1 sur l'homéostasie du glucose.

## 2 METHODOLOGIE

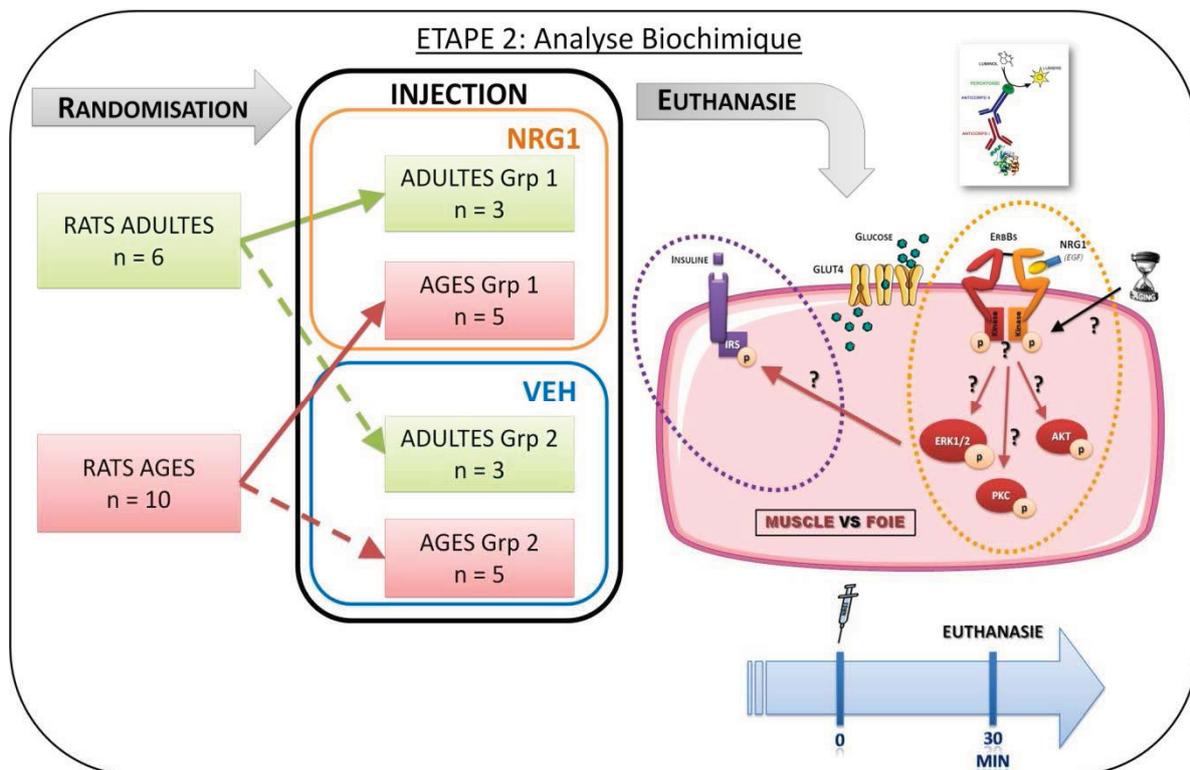
### 2.1 PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Des rats âgés (n=10 ; 22 mois) et adultes (n= 6 ; 6 mois) ont été utilisés pour cette étude. Dans un premier temps, les rats ont été soumis à un OGTT avec injection soit de NRG1, soit de VEH (solution saline). La glycémie était analysée *in situ* et du sang était prélevé pour l'analyse ultérieure de la concentration en insuline. Chaque rat était son propre contrôle et 7 jours ont donc été laissés aux animaux entre les deux sessions.



SCHEMA DU PROTOCOLE EXPERIMENTAL : OGTT AVEC OU SANS INJECTION DE NRG1

Dans un deuxième temps, les deux groupes de rats (ADULTES, AGES) ont été subdivisé en 4 sous groupes (VEH AGES, VEH ADULTES, NRG1 AGES, NRG1ADULTES) en vue d'une injection de NRG1 ou de VEH. 30 min après l'injection de NRG1, les animaux ont été euthanasiés et le foie ainsi que le muscle ont été prélevés en vue des analyses biochimiques.



SCHEMA DU PROTOCOLE EXPERIMENTAL : ANALYSE BIOCHIMIQUE POST INJECTION DE NRG1

## 2.2 MODELES EXPERIMENTAUX ET MESURES REALISEES

Les détails techniques et méthodologiques relatifs aux animaux (p93) et à leur euthanasie (p99), aux OGTT et aux mesures métaboliques (p94), aux injections de NRG1 (p99) et enfin aux expérimentations biochimiques (p100) peuvent être trouvés dans la partie *MATERIEL ET METHODES* de ce manuscrit.

### 3 RÉSULTATS

#### 3.1 COMPOSITION CORPORELLE ET CARACTERISTIQUES METABOLIQUES

L'analyse des caractéristiques morphologiques et des mesures métaboliques des rats adultes et âgés (tableau 1) a montré que le poids, la masse maigre (g et %) et la masse grasse (g et %) étaient significativement plus élevés dans le groupe âgé (n = 10) par rapport au groupe adulte (n = 6) (p <0.05). Cependant, la glycémie à jeun, les niveaux d'insuline et l'indice HOMA ne différaient pas entre les groupes (p = 0.21, 0.95 et 0.95, respectivement).

**TABEAU 1: CARACTERISTIQUES MORPHOLOGIQUES ET METABOLIQUES DES ANIMAUX.**

Les valeurs sont exprimées sous forme de: moyennes  $\pm$  SEM. \* p <0.05.

	<b>ADULTE n= 6</b>	<b>AGE n= 10</b>
Age	6-mois	22-mois
Pods (g)	452.5 $\pm$ 17.9	544.0 $\pm$ 17.8 *
Masse maigre (g)	402.6 $\pm$ 19.8	444.0 $\pm$ 29.1 *
Masse maigre (%)	88.9 $\pm$ 2.9	81.6 $\pm$ 4.1 *
Masse grasse (g)	49.9 $\pm$ 13.7	100.0 $\pm$ 21.1 *
Masse grasse (%)	11.0 $\pm$ 2.7	18.3 $\pm$ 3.9 *
Glycémie à jeun (mmol.L <sup>-1</sup> )	4.8 $\pm$ 0.3	4.6 $\pm$ 0.3
Taux d'insuline plasmatique à jeun (mUI.L <sup>-1</sup> )	20.6 $\pm$ 4.5	23.8 $\pm$ 14.2
HOMA <sup>#</sup>	4.3 $\pm$ 1.0	5.0 $\pm$ 3.4

## 3.2 RESULTATS DU OGTT

Afin d'explorer l'effet de la NRG1 sur l'homéostasie du glucose, les rats adultes et âgés ont reçu 50  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  de NRG1 ou de la solution saline (VEH) par voie intraveineuse 15 min avant une charge de glucose *per os* (2g.kg<sup>-1</sup>). Les concentrations de glucose sanguines et d'insuline plasmatiques ont ensuite été mesurées à différents temps pendant plus de 120 minutes (Fig. 30 et 32).

### 3.2.1 REPONSES GLYCEMIQUES:

#### 3.2.1.1 CINETIQUES GLYCEMIQUES

Il n'y avait pas de différence significative dans les taux de glucose sanguin à jeun entre les deux groupes (Tableau 1). Après la charge de glucose *per os*, la glycémie a augmenté significativement chez tous les rats (effet temps:  $p < 10^{-6}$ ). Néanmoins, la concentration de glucose dans le sang au cours du OGTT était significativement inférieure chez les rats adultes (NRG1+VEH) par rapport aux rats âgés (NRG1+VEH) (effet âge :  $p = 0.025$ ; figure 31) et chez les rats traités à la NRG1 par rapport à ceux traités avec le VEH, indépendamment de leur âge (effet NRG1:  $p = 0.005$ ; figure 31). Aucune interaction temps, âge et NRG1 n'a été observée.

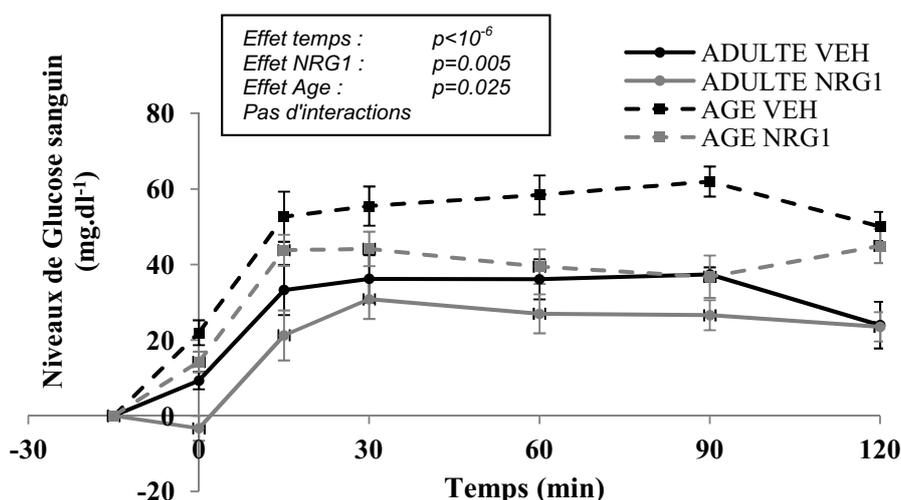


FIGURE 30 : EFFETS D'UNE INJECTION AIGUË DE NRG1 SUR LES NIVEAUX DE GLUCOSE DANS LE SANG PENDANT UN TEST DE TOLÉRANCE ORALE AU GLUCOSE CHEZ L'ADULTE ET CHEZ DES RATS AGES.

Les rats adultes ( $n = 6$ ) et âgés ( $n = 10$ ) ont reçu une injection iv (veine caudale) de véhicule (VEH) ou NRG1 et une charge de glucose *per os*. La glycémie dans les groupes NRG1 et VEH au cours de l'OGTT est représenté après soustraction de la concentration de référence (début du test).

### 3.2.1.2 AUC NET GLUCOSE

En accord avec les résultats obtenus sur la cinétique glycémique, les AUC net glucose sont plus élevés chez les rats âgés, indépendamment du traitement (effet âge:  $p < 10^{-6}$ , Fig. 31). En revanche, les AUC net glucose sont inférieurs chez les rats traités avec la NRG1 comparés aux contrôles (effet NRG1:  $p = 0.002$ ). Aucune interaction (âge x NRG1) n'a été notée pour les AUC net.

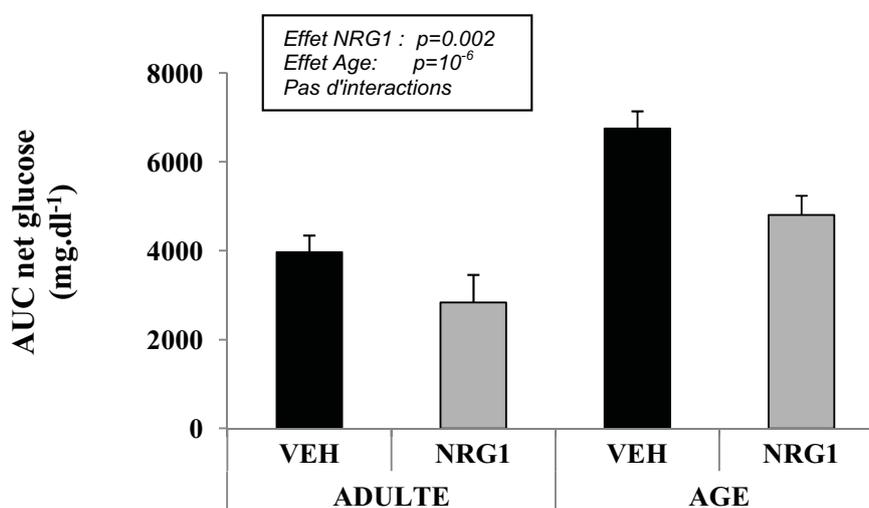


FIGURE 31 : AUC NET GLUCOSE DURANT L'OGTT

Les AUC net de la glycémie dans les quatre groupes sont calculées après soustraction de la concentration de référence pour chaque rat (début du test). Les valeurs sont représentées sous forme de moyennes  $\pm$  SEM.

### 3.2.2 REPONSES INSULINIQUES :

En parallèle, nous avons également exploré les niveaux plasmatiques d'insuline durant l'OGTT.

#### 3.2.2.1 CINETIQUES INSULINIQUES

Il n'y avait aucune différence significative dans les taux d'insuline plasmatique à jeun entre les groupes (tableau 1). Après la charge de glucose *per os*, les niveaux d'insuline plasmatique sont significativement augmentés tous groupes confondus (effet temps:  $p < 10^{-6}$ ). Cependant, ils étaient plus élevés chez les animaux âgés que chez les rats adultes (effet âge:  $p = 0.019$ ; figure 33). Les niveaux d'insuline plasmatique ont tendance à être plus faibles chez les rats traités avec la NRG1 que chez les rats traités avec le VEH (effet NRG1:  $p = 0.054$ ; figure 33). Aucune interaction significative entre le temps, l'âge et le traitement à la NRG1 n'a été observée.

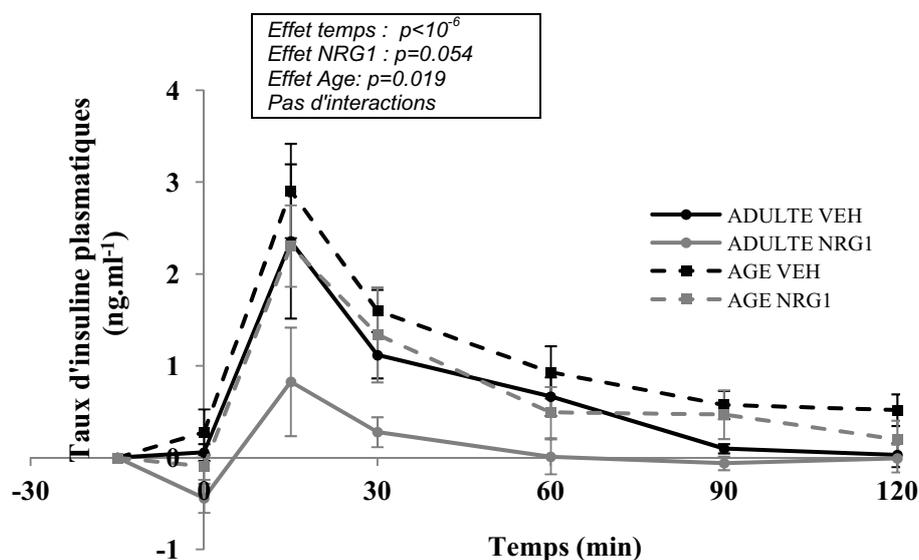


FIGURE 32: EFFETS D'UNE INJECTION AIGUË DE NRG1 SUR LES NIVEAUX D'INSULINE PLASMATIQUE AU COURS DE L'OGTT CHEZ DES RATS ADULTES ET AGES.

Les rats adultes ( $n = 6$ ) et âgés ( $n = 10$ ) ont reçu une injection iv (veine caudale) de véhicule (VEH) ou NRG1 et une charge de glucose *per os*. Le taux d'insuline plasmatique dans les groupes NRG1 et VEH au cours de l'OGTT est représenté après soustraction de la concentration de référence (début du test). Les valeurs sont représentées sous forme de moyennes  $\pm$  SEM.

### 3.2.2.2 AUC NET POUR L'INSULINE

De même, les AUC net d'insuline étaient plus élevés dans le groupe âgé par rapport au groupe adulte (effet d'âge:  $p = 0,016$ , figure 2C.). En revanche, aucune différence significative dans les valeurs de l'AUC net d'insuline plasmatique n'a été observée entre les animaux traités avec la NRG1 et ceux traités avec le VEH ( $p = 0,07$ ) même si une tendance à la diminution est observable; figure 2C). Aucune interaction significative (âge x NRG1) n'a été observée concernant les AUC net d'insuline.

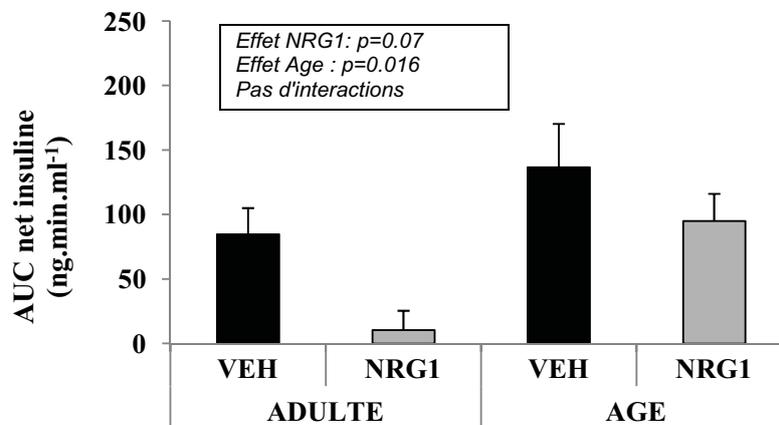


FIGURE 33: AUC NETS DE L'INSULINE PLASMATIQUE PENDANT L'OGTT

Les valeurs sont représentées sous forme de moyennes  $\pm$  SEM.

### 3.2.2.3 HIRI ET MISI:

Pour explorer davantage le mécanisme par lequel la NRG1 peut influencer l'homéostasie du glucose au niveau systémique, des indices de résistance hépatique à l'insuline (HIRI) et de sensibilité musculaire à l'insuline (MISI) ont été calculés durant l'OGTT. Le HIRI était significativement plus faible chez les adultes et les animaux traités à la NRG1 comparés aux rats âgés et aux rats traités avec le VEH ( $p < 10^{-4}$  et  $p = 0.034$ , respectivement) (Fig. 34A). Aucune interaction (âge x NRG1) n'a été observée. Le MISI n'était pas affecté par l'âge ou le traitement à la NRG1 (Fig. 34B).

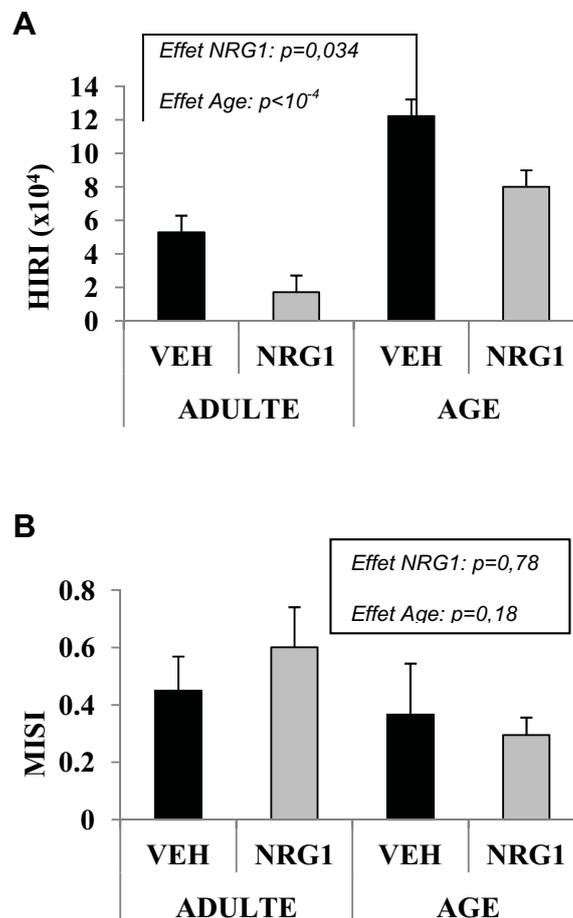


FIGURE 34: EFFETS D'UNE INJECTION AIGUË DE NRG1 SUR LES INDICES HIRI ET MISI DURANT UN OGTT.

(A) HIRI : indice hépatique de résistance à l'insuline (B) MISI (indice de sensibilité musculaire à l'insuline). Les valeurs sont représentées sous forme de moyennes  $\pm$  SEM.

### **3.3 LES ANALYSES BIOCHIMIQUES**

Les mécanismes par lesquels la NRG1 peut influencer l'homéostasie du glucose ont été étudiés par l'évaluation, dans le foie et le muscle squelettique (gastroc), du niveau basal d'expression des récepteurs ErbB mais également par les ratios de phosphorylation (ErbB total / ErbB phosphorylé) 30min après l'injection (veine de la queue) de 50  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  NRG1 ou d'une solution saline. Les protéines clés de la signalétique en aval de la voie de signalisation ErbB (AKT, MAPK et PKC $\xi$ ) ont également été évaluées.

### 3.3.1 EXPRESSION BASALE DES ERBBS

Le niveau d'expression basal des récepteurs ErbBs était différent dans le foie et dans le muscle squelettique des rats adultes (Fig.35). Les quantités d'ErbB3 et d'ErbB1 étaient 10 fois et 2 fois plus élevées dans le foie que dans le muscle squelettique, respectivement (Fig. 35B et C). A l'inverse, le niveau d'ErbB4 était 2 fois plus élevé dans le muscle squelettique que dans le foie (Fig. 35D). L'ErbB2 était faiblement exprimé dans le muscle squelettique et presque totalement absent du foie.

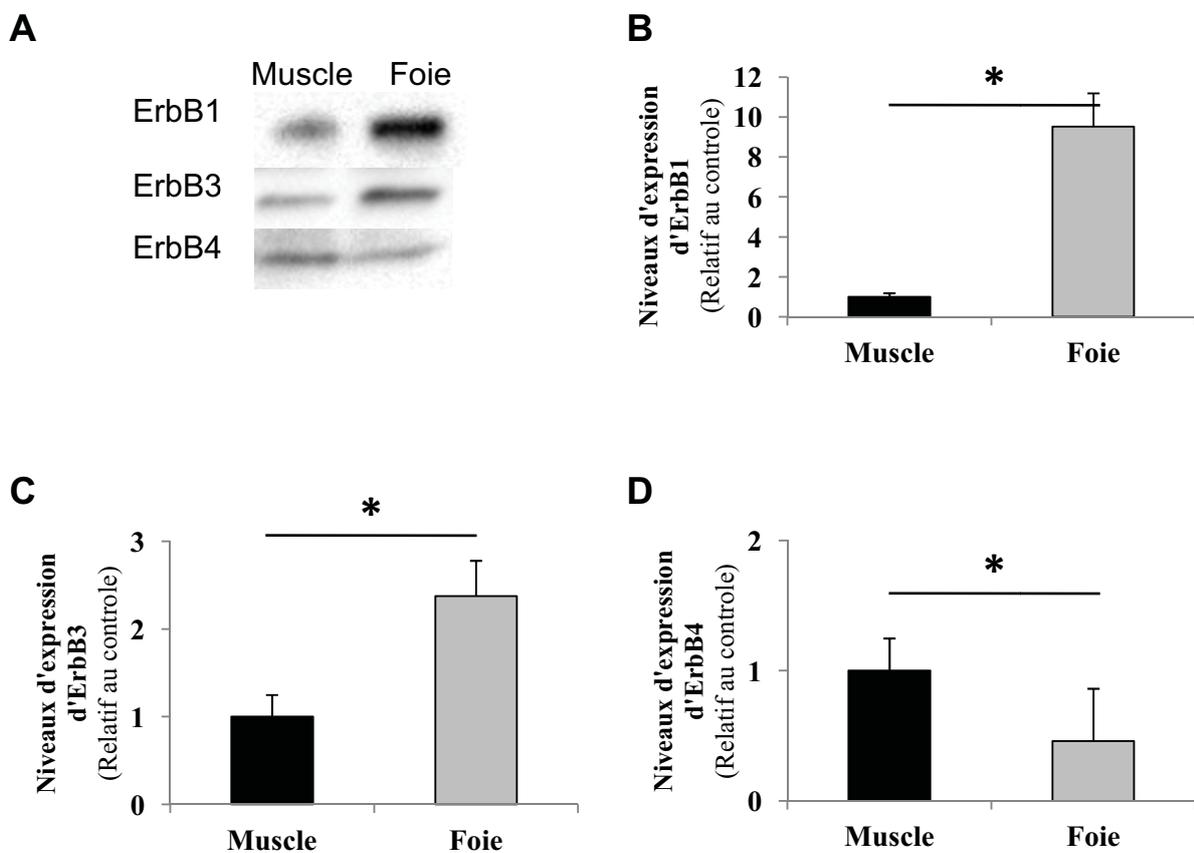


FIGURE 35: EXPRESSION BASALE DES ERBBS DANS LE GASTROCNEMIEN ET LE FOIE DE RATS ADULTES.

Les valeurs sont représentées sous forme de moyennes  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$

### 3.3.2 VOIES DE SIGNALISATION MUSCULAIRE

#### 3.3.2.1 RECEPTEURS ERBBs

Les ratios de phosphorylation des ErbBs dans les gastrocnémiens n'étaient pas significativement différents entre les rats traités avec la NRG1 ou le VEH. De plus, aucune différence significative n'a été observée entre les rats adultes et les rats âgés et aucune interaction (âge x NRG1) (Fig. 36B-E).

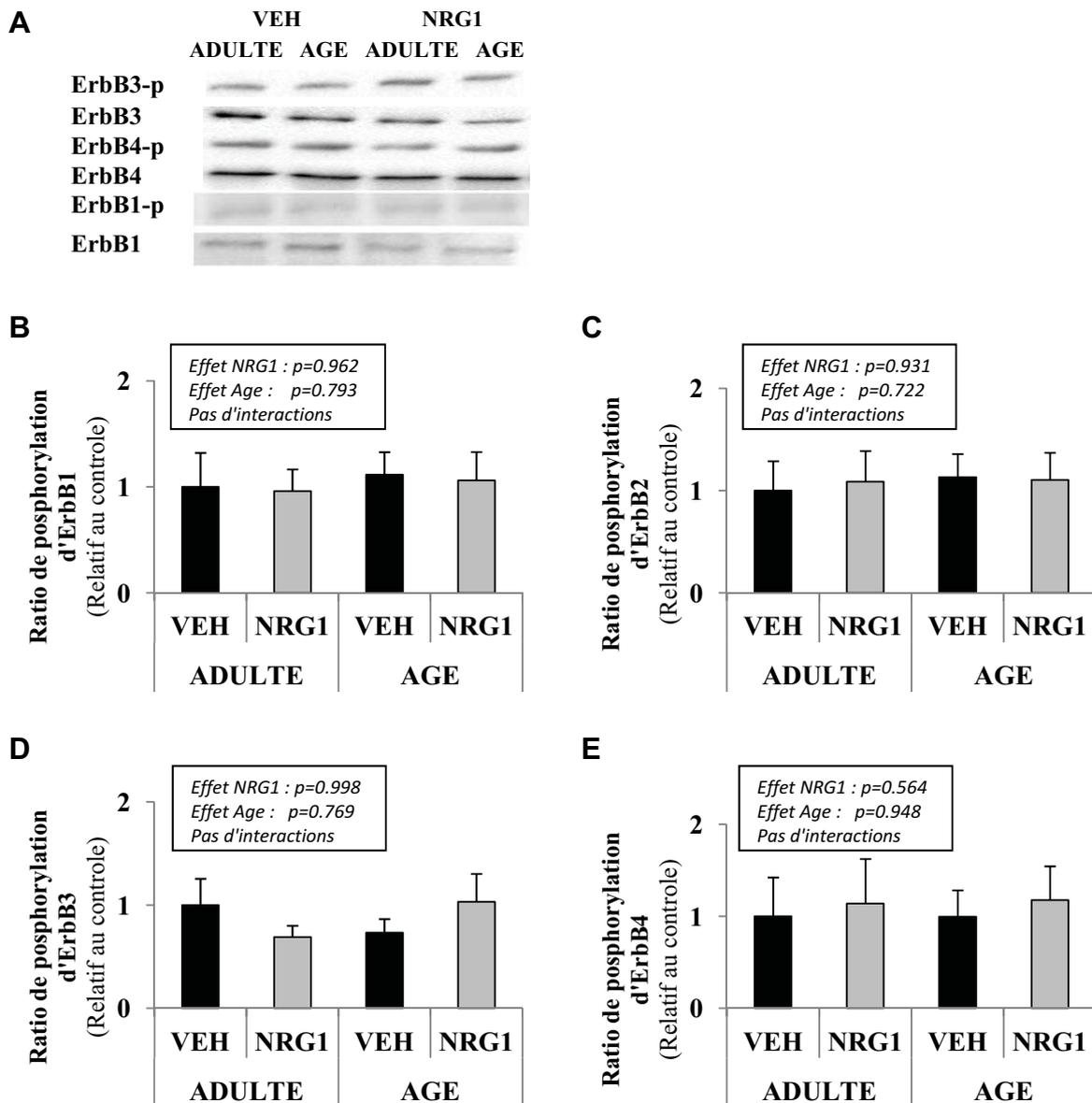


FIGURE 36: EFFET D'UNE INJECTION AIGUË DE NRG1 SUR LES RATIOS DE PHOSPHORYLATION DES ERBBs DANS LE GASTROCNEMIEN DE RATS ADULTES ET AGES.

Les valeurs sont représentées sous forme de moyennes  $\pm$  SEM.

### 3.3.2.2 VOIES DE SIGNALISATION INTRACELLULAIRES

Les rapports de phosphorylation des protéines AKT (Ser473), P42/P44 MAPK (Thr202/Tyr204) et PKC $\zeta$  (Thr410), trois kinases qui sont activées par la transactivation des récepteurs ErbBs, ne sont pas significativement affectés par l'injection de NRG1 (Fig. 37B-D). De même, la phosphorylation de l'AMPK n'a pas été modifiée suite à l'injection de NRG1 (données non présentées). De plus, des muscles de rat *ex vivo* ont été incubés avec de la NRG1 ou de l'insuline. Alors que l'insuline stimule l'absorption du 2-désoxyglucose, la NRG1 n'a eu aucun effet (données non présentées).

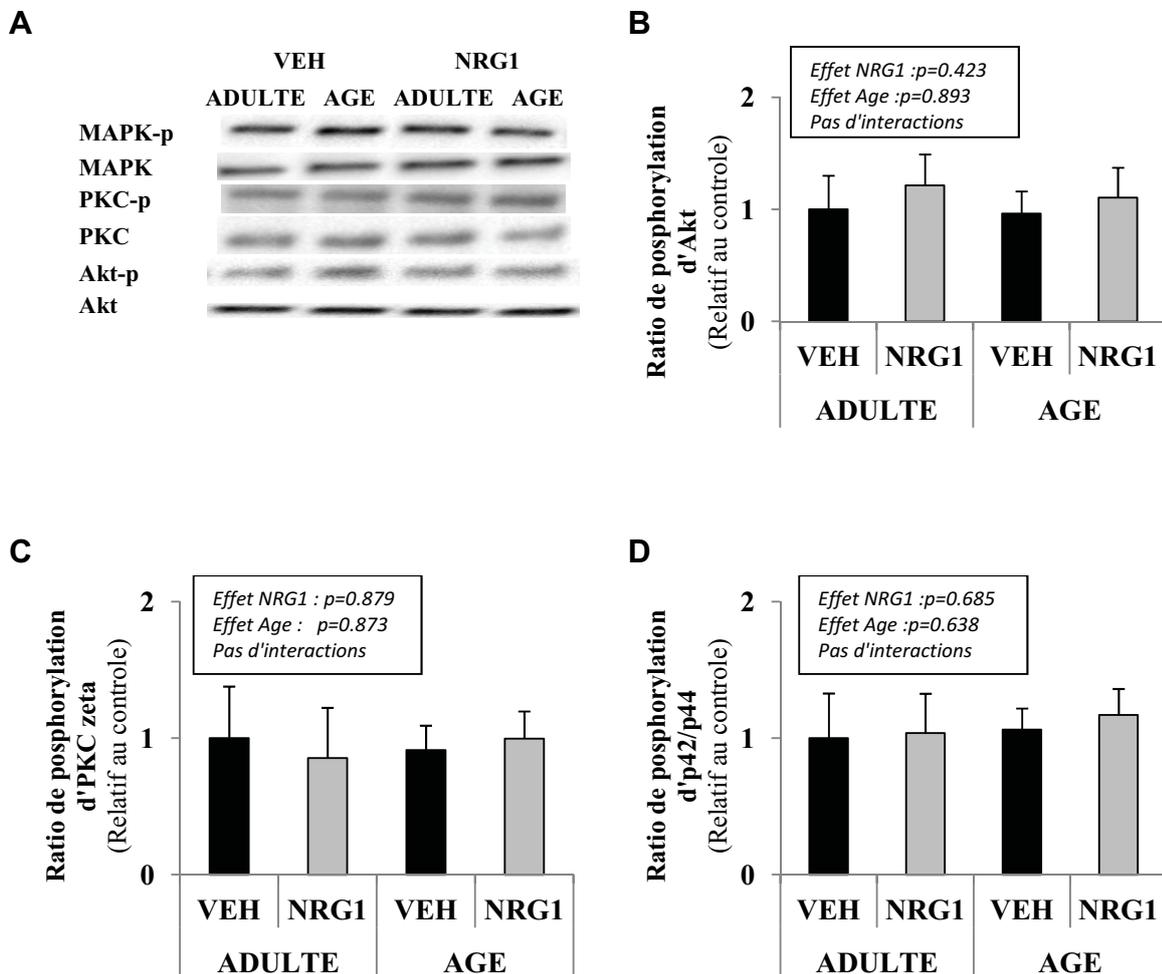


FIGURE 37: EFFET D'UNE INJECTION AIGUË DE NRG1 SUR LES RATIOS DE PHOSPHORYLATION D'AKT, DE P42/P44 ET DE PKCZETA DANS LE GASTROCNEMIEN DE RATS ADULTES ET ÂGÉS.

Les valeurs sont représentées sous forme de moyennes  $\pm$  SEM.

### 3.3.3 VOIES DE SIGNALISATION HEPATIQUE

#### 3.3.3.1 RECEPTEURS ERBBS

L'injection de NRG1 n'a pas affecté les ratios de phosphorylation d'ErbB1 et d'ErbB4 dans le foie (Fig. 38B et C). Cependant, le rapport de phosphorylation d'ErbB3 a été augmenté de façon significative chez les animaux traités en NRG1 par rapport aux rats traités avec le VEH, indépendamment de leur âge (effet de NRG1:  $p = 0.009$ ; Fig. 38D).

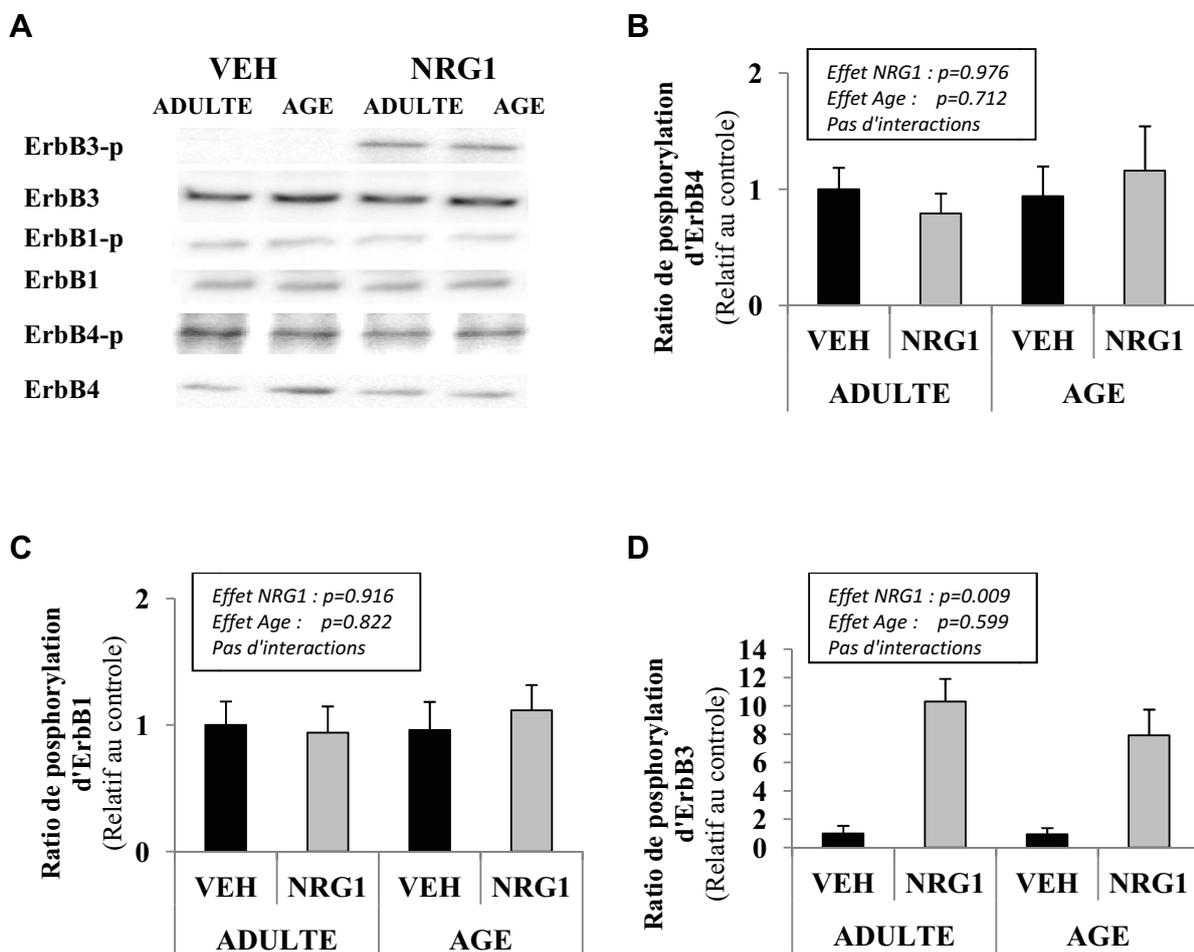


FIGURE 38: EFFET D'UNE INJECTION AIGUË DE NRG1 SUR LES RATIOS DE PHOSPHORYLATION DES ERBBS DANS LE FOIE DE RATS ADULTES ET AGES.

Les valeurs sont représentées sous forme de moyennes  $\pm$  SEM.

Ce récepteur possédant de nombreux sites de liaison à PI3K (Schulze et al, 2005), nous avons ensuite exploré la protéine Akt qui se situe en aval de cette protéine.

### 3.3.3.2 VOIES DE SIGNALISATIONS INTRACELLULAIRES

La phosphorylation d'Akt a été augmentée après le traitement à la NRG1 dans les groupes adultes et âgés (effet de NRG1:  $p = 0.002$ ). Ni effet âge, ni interaction effet âge x NRG1 n'a été observée (Fig. 39).

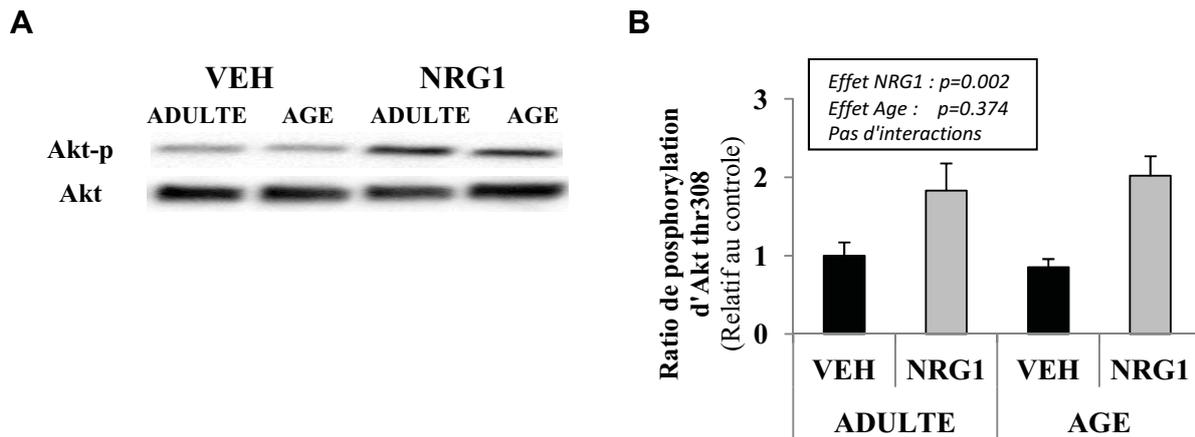


FIGURE 39: EFFET D'UNE INJECTION AIGUË DE NRG1 SUR LES RATIOS DE PHOSPHORYLATION D'AKT DANS LE FOIE DE RATS ADULTES ET AGES.

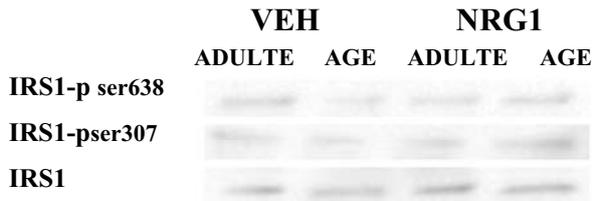
Les valeurs sont représentées comme suit : moyenne  $\pm$  SEM.

Nous avons ensuite exploré la phosphorylation en sérine des substrats du récepteur à l'insuline. En effet, c'est par ce biais que l'activation des ErbBs induit une résistance à l'insuline.

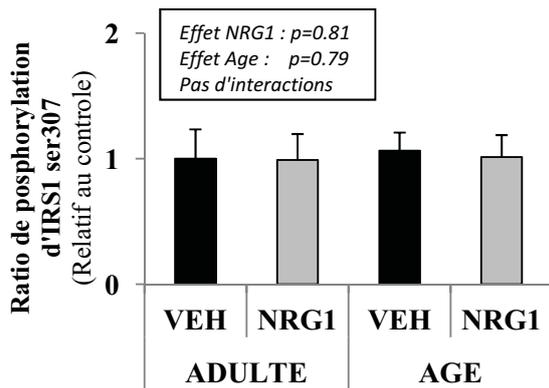
### 3.3.3.3 RECEPTEUR A L'INSULINE

Dans le foie, la phosphorylation d'IRS1 sur ces résidus Ser307 et Ser638 n'a pas été augmentée par le traitement à la NRG1 (Fig. 40).

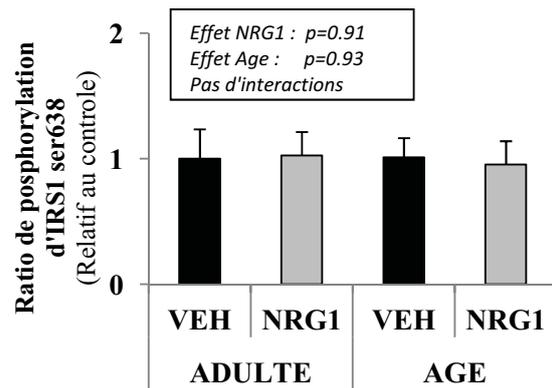
**A**



**B**



**C**



**FIGURE 40: EFFET D'UNE INJECTION AIGUË DE NRG1 SUR LES RATIOS DE PHOSPHORYLATION D'AKT DANS LE FOIE DE RATS ADULTES ET AGES.**

Les valeurs sont représentées comme suit : moyenne ± SEM.

## 4 DISCUSSION

Le but de cette étude était de déterminer si la voie de signalisation NRG1/ErbB influence le métabolisme du glucose à l'échelle systémique et si cet effet est dépendant de l'âge. Nos résultats indiquent que l'injection de NRG1 améliore en aigu la tolérance au glucose suite à une charge de glucose *per os* quelque soit l'âge. De plus, on observe une amélioration de l'indice HIRI, obtenu à partir de l'OGTT après l'injection de NRG1. A l'inverse, le MISI reste inchangé. En outre, l'injection aiguë de NRG1 a activé ErbB3 dans le foie, mais pas dans le muscle squelettique quel que soit l'âge. Pris dans leur ensemble, ces résultats montrent que l'injection aiguë de NRG1 améliore le métabolisme du glucose *in vivo* chez des rats adultes et âgés. De plus, le foie semble être le tissu cible de la NRG1 permettant cette baisse des niveaux de glucose sanguin.

### ***La voie NRG1/ErbB n'est pas activée au niveau musculaire***

Le muscle squelettique est le tissu principalement impliqué dans la captation du glucose en situation postprandiale, et l'insulino-résistance du muscle squelettique est un élément clé de l'intolérance au glucose associée au diabète de type 2 (De Fronzo et Tripathy 2009). Par conséquent, l'augmentation de l'absorption du glucose par le muscle squelettique induite par la NRG1 est une hypothèse séduisante pour expliquer l'effet hypoglycémiant de la NRG1. Particulièrement compte tenu des études précédentes réalisées *in vitro* sur des cellules L6E9 (Suarez et al, 2001; Canto et al, 2004) montrant que la NRG1 augmente la captation du glucose de manière similaire et additive à l'insuline (Suarez et al, 2001; Canto et al, 2004). Cet effet est médié par la translocation du transporteur de glucose 4 (GLUT4) vers le sarcolemme via l'activation d'ErbB3 et sa signalétique intracellulaire dépendante de PI3K (Suarez et al, 2001; Canto et al, 2004).

A contrario, nos résultats *in vivo* sur l'indice MISI à partir de l'OGTT montrent qu'il n'est pas affecté par l'injection aiguë de NRG1. Ceci suggère que le muscle squelettique n'est pas le tissu prioritairement impliqué dans l'effet hypoglycémiant de la NRG1 *in vivo*. En accord avec cela, l'analyse par western blot de la phosphorylation des ErbBs dans les échantillons de muscles squelettiques après une injection aiguë de NRG1 n'a pas montré leur activation. En outre, AKT, p42/p44mapk

et PKCzeta, trois kinases impliquées dans la signalisation en aval des ErbBs, n'ont pas été activées lors de l'injection de NRG1. Nous avons également confirmé sur des échantillons *ex vivo* de muscles squelettiques de rat que l'incubation avec de la NRG1 n'a pas augmenté l'absorption du glucose dans le muscle squelettique (données non représentées).

Deux hypothèses pourraient expliquer cet écart entre nos résultats et les études précédentes menées *in vitro* (Suarez et al, 2001; Canto et al, 2004). Tout d'abord, le muscle squelettique adulte *in vivo* peut réagir différemment de myoblastes en culture lors d'une exposition à la NRG1. A titre d'exemple, la NRG1 était capable d'activer AKT sur des cellules L6E9 en culture mais pas dans le muscle *ex vivo* de jeunes rats (Canto et al, 2004). D'autre part, les récepteurs ErbBs sont faiblement exprimés dans le muscle squelettique de rongeurs adultes comparativement à des myoblastes C2C12 et des cellules L6E9 de rat (Huang et al, 2002). En outre, la constatation qu'ErbB1 et ErbB3 sont plus fortement exprimés dans le foie que dans le muscle squelettique renforce l'hypothèse que la faible expression de certains récepteurs ErbBs pourrait atténuer l'effet potentiel de la NRG1 dans le muscle squelettique. Enfin, nous avons traité nos animaux avec la protéine recombinante  $\beta$ 2-NRG1 (Liu et al, 2006), alors que les myoblastes ont été incubées avec de la  $\beta$ 1-NRG1 (Canto et al, 2004 ; Canto et al, 2006 ; Canto et al, 2007). Ainsi, il pourrait être supposé que dans le muscle squelettique, les récepteurs ErbBs sont moins sensibles à la forme  $\beta$ 2 qu'à la forme  $\beta$ 1 de la NRG1.

### ***Le foie est le tissu cible de la NRG1***

Contrairement à l'indice MISI, le HIRI a été amélioré par l'injection aiguë de NRG1 chez les rats quel que soit leur âge. Ce résultat oriente vers une implication du foie dans l'effet hypoglycémiant de la NRG1. En effet, les valeurs du HIRI obtenues à partir de l'OGTT reflètent les variations de la glycémie et de l'insulinémie dans la phase précoce (0-30 min) après la charge de glucose. Or, il a été montré le rôle prépondérant du foie durant cette phase et donc la corrélation du HIRI avec la résistance à l'insuline hépatique (Abdul-Ghani et al, 2007). Très peu d'études ont exploré l'effet de NRG1 dans le foie.

Carter et al. ont montré dans les hépatocytes de rats que l'insuline entrave effectivement la fixation de la NRG1 sur ErbB3 et diminue l'expression de celui-ci par

la voie dépendante de PI3K (Carver et al, 1997). Inversement, la transactivation d'ErbB2 et ErbB3 induit une phosphorylation d'IRS-1 sur son résidu sérine. Ce mécanisme va inhiber la phosphorylation en tyrosine et diminue l'association d'IRS-1 avec la sous-unité p85 de PI3K (Hemi et al, 2002). Plus récemment, Hemi et al. (2011) ont confirmé chez des souris ob/ob que la transactivation des récepteurs ErbBs, via p38MAPK, induit une phosphorylation d'IRS-1 en sérine (Hemi et al, 2011).

Partant de ces observations, l'hypothèse que la NRG1 pourrait améliorer la sensibilité à l'insuline hépatique est plutôt improbable. D'autre part, nous pourrions supposer que la NRG1 perturbe la signalisation de l'insuline au niveau hépatique. Cependant, les niveaux de phosphorylation d'IRS1 en Ser307 et Ser638 (deux résidus qui sont phosphorylés par l'activation des ErbBs dépendante de p38MAPK) ne sont pas augmentés chez les animaux traités avec de la NRG1. Par conséquent, la transactivation des récepteurs ErbBs pourrait déclencher des cascades de signalisation différentes en fonction du ligand, et l'activation de ces récepteurs par la NRG1 *in vivo* ne porterait pas atteinte à la fonctionnalité d'IRS1. Pour compléter l'investigation de ce résultat, il serait approprié de réaliser une injection d'insuline après celle de NRG1 pour vérifier si la fonctionnalité d'IRS1 est préservée.

### ***La voie de la NRG1 est activée dans le foie***

Nos résultats montrent que l'injection de NRG1 induit une activation significative d'ErbB3 dans le foie, ce qui renforce l'hypothèse d'un effet hypoglycémiant de la NRG1 centré sur la fonction hépatique. Comme les autres récepteurs ErbBs ne sont pas phosphorylés et que le récepteur ErbB3 possède une kinase inactive (Guy et al, 1994), nous suggérons que les injections de NRG1 pourraient favoriser la dimérisation du récepteur ErbB3 avec un autre ErbB possédant lui une kinase active responsable alors de la phosphorylation d'ErbB3 (transphosphorylation). Comme le récepteur ErbB1 est fortement exprimé dans le foie, le dimère ErbB1/ErbB3 est le plus probablement formé suite à l'injection systémique de NRG1. En effet, il a déjà été montré dans différentes lignées cellulaires que la NRG1 peut induire la dimérisation d'ErbB1 et ErbB3 et provoquer ainsi la phosphorylation d'ErbB3 sans celle d'ErbB1 (Khan et al, 2010; Frolov et al, 2007). Par ailleurs, l'observation d'un niveau de phosphorylation d'AKT augmenté dans le foie, suite à l'injection de NRG1,

conforte nos hypothèses et une signalétique cellulaire possible pour expliquer l'effet hypoglycémiant de la NRG1. En effet, AKT est un acteur majeur de l'inhibition insulino-dépendante de la production de glucose hépatique, cet effet est permis par la modulation de l'expression des gènes codant pour des protéines de la néoglucogénèse (Whiteman et al, 2002).

Les niveaux de glycémie plus bas observés chez les rats traités avec la NRG1 pourraient également être liés à un effet de la NRG1 sur la sécrétion d'insuline par le pancréas. Cependant, contrairement à la NRG4, la NRG1 n'augmente pas la production d'insuline dans une lignée cellulaire CRI-G1 dérivée d'îlots de Langerhans (Sud et al, 2013). A contrario, les niveaux d'insuline ont plutôt tendance à baisser durant l'OGTT après l'injection de NRG1 (Fig. 32 ;  $p=0.054$ ).

### ***Pas d'effet du vieillissement***

Chez les humains et les rats, le vieillissement est associé avec une hausse des niveaux de glucose et d'insuline durant un OGTT (Davidson 1979; Curry et al, 1984). Ce phénomène a été attribué en partie au développement d'une résistance systémique à l'insuline durant le vieillissement (Kalyani et Egan 2013). Dans notre étude, comme attendu, les niveaux de glucose et d'insuline sont plus élevés dans le groupe âgé pendant l'OGTT. Cependant, aucune interaction n'a été observée entre l'âge et la réponse glycémique ou insulinémique suite à l'injection de NRG1. Ainsi, si le traitement à la NRG1 montre un effet hypoglycémiant lors de l'OGTT, celui-ci n'est pas affecté par la différence d'âge des animaux. Ceci est confirmé au niveau cellulaire, où l'injection de NRG1 a augmenté la phosphorylation de l'ErbB3 et d'AKT dans le foie de manière similaire chez les rats adultes et âgés. La signalétique de l'insuline dans le foie est progressivement altérée durant le vieillissement. Le maintien de l'activité hypoglycémiante de la NRG1 chez des rats âgés (22 mois) suggère un potentiel thérapeutique prometteur sur ce type de population. Néanmoins, nous ne pouvons pas exclure la possibilité que des animaux plus âgés pourraient présenter certaines altérations dans la signalisation NRG1/ErbB.

## **Conclusion**

Cette étude montre que l'injection aigue de NRG1 améliore la tolérance au glucose pendant un OGTT chez des rats adultes et âgés (22 mois). L'effet hypoglycémiant de la NRG1 semble impliquer le foie mais pas le muscle squelettique. La NRG1 n'a pas augmenté le niveau de phosphorylation des ErbBs dans le muscle squelettique, tandis que la phosphorylation d'ErbB3 et d'AKT ont été induites de manière significative dans le foie. Enfin, aucune interaction entre âge et effet du traitement à la NRG1 n'a été notée concernant les réponses à l'OGTT et les différentes signalétiques intracellulaires hépatiques. Ces résultats indiquent donc que la NRG1 pourrait être une cible thérapeutique très intéressante dans un contexte de résistance à l'insuline chez des rats jeunes ou présentant les premières perturbations attribuables au vieillissement. D'autres expérimentations sont nécessaires pour déterminer précisément les rôles respectifs des nombreuses isoformes de NRG1 dans la régulation de l'homéostasie du glucose. De plus, la question des effets chroniques de la NRG1 sera complémentaire des résultats que nous avons obtenu en aigue. En effet, nous avons réalisé un protocole chez des souris normo-pondérées ou obèse diabétique de type 2 (db/db) et nous avons observé une réduction de la prise alimentaire concomitante d'une réduction du niveau de leptine uniquement dans le groupe normo-pondérée. Le même type d'investigation sur des animaux âgés serait très intéressant à réaliser.

---

ETUDE 2 : CONTRACTION MUSCULAIRE *IN*  
*VIVO* ET ACTIVATION DE LA VOIE  
NRG1/ERBB : EFFET DU VIEILLISSEMENT.

# 1 INTRODUCTION

L'ensemble des altérations physiologiques liées à l'âge se traduisent par une atteinte fonctionnelle et un risque accru de mortalité (Pae et al, 2012). L'un des principaux symptômes, observables en clinique, est la « Sarcopénie ». Ce terme, proposé en 1989 par Rosenberg, définit la perte de masse musculaire spécifiquement liée à l'âge (Rosenberg 1997) mais il a été étendu à la perte de force musculaire. Cette atrophie n'est toutefois pas le seul facteur de déficit fonctionnel. En effet, une observation histologique du tissu musculaire âgé révèle des inclusions lipidiques et une fibrose, dont les origines sont intimement liées à la dérégulation métabolique globale, liée à l'âge (Narici et Maffulli, 2010). Celle-ci inclut notamment une insulino-résistance, un stress oxydant et des processus inflammatoires (De Tata et al, 2014 ; Narici et Maffulli, 2010).

La recherche de solutions thérapeutiques pour lutter contre la sarcopénie se doit de prendre en compte le caractère plurifactoriel de ce type de pathologie. La NRG1 est une protéine dont l'expression ainsi que les actions sont relativement ubiquitaires (Falls 2003). Ce facteur de croissance connu pour ses propriétés neurotrophiques et myogéniques pourrait donc constituer une voie d'investigation prometteuse dans la lutte contre l'atrophie liée à l'âge. En effet, la NRG1 a démontré sa capacité à induire la protéosynthèse sur des cardiomyocytes isolés (Cote et al, 2005) ainsi que sur des cellules musculaires C2C12 et du diaphragme de rat (Hellyer et al, 2006). De plus, il a été établi que les nerfs périphériques provenant d'animaux âgés présentent des irrégularités morphologiques et fonctionnelles importantes (Melcangi et al, 2011). Or, la NRG1 a été utilisée avec succès dans le traitement de maladies neurodégénératives chez l'animal (Marchionni et al, 1999 ; Fledrich et al, 2014). Aussi son potentiel thérapeutique pourrait également se situer à ce niveau.

La NRG1 est de plus impliquée dans la régénération de la jonction neuromusculaire (JNM) (Fricker et al, 2011). Ceci pourrait être d'un intérêt substantiel dans la mesure où la JNM se fragmente durant le vieillissement du fait d'une régénération imparfaite (Li et al, 2011). De même, une diminution du nombre de cellules satellites et/ou une perte de la fonctionnalité de celles-ci est constatée durant le vieillissement (Chakkalakal et Brack, 2012), alors que la NRG1 est fortement exprimée dans les

cellules satellites et les motoneurones durant la régénération musculaire chez l'animal adulte (Hirata et al, 2007).

Ces données convergent pour suggérer un rôle important de la NRG1 dans les processus de régénération. Parallèlement à cela, des études *in vitro* ont montré que la NRG1, en traitement chronique, induit une biogénèse mitochondriale et augmente ainsi la sensibilité à l'insuline (Canto et al, 2004 ; Canto et al, 2007). Or, on observe une baisse significative de la masse mitochondriale avec l'âge (Welle et al, 2003) qui pourrait en partie participer au déclin de la protéosynthèse musculaire chez les personnes âgées (Drummond et al, 2008).

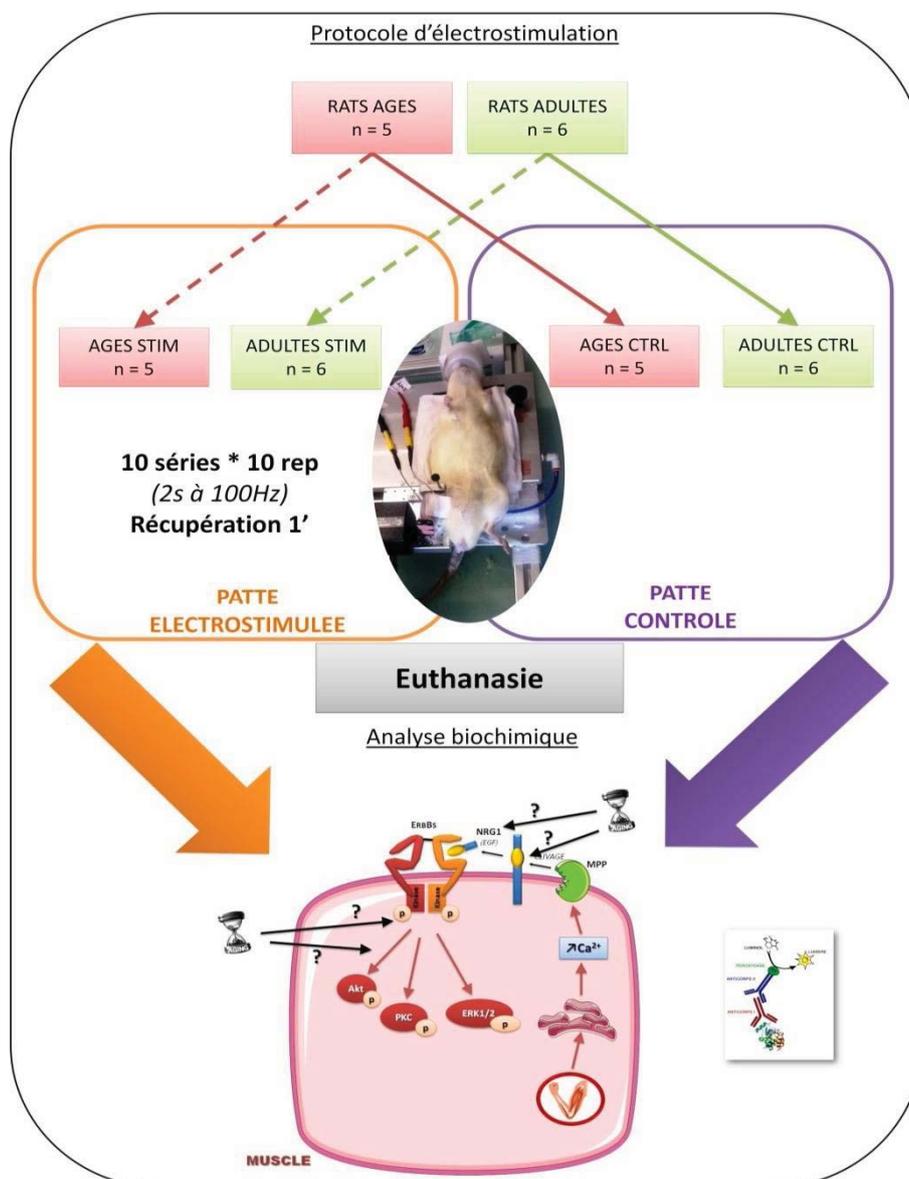
L'activité physique, en force ou en endurance, a bien montré ses effets positifs sur la sarcopénie et notamment par le biais de la biogénèse mitochondriale (Forbes et al, 2012). Tous les mécanismes cellulaires impliqués ne sont pas connus mais un grand nombre de facteurs de croissance produits lors de l'exercice physique pourraient participer à ces améliorations (Pedersen et Febbraio, 2012). La NRG1 pourrait intervenir à ce niveau. En effet, cette protéine semble libérée lors d'un exercice physique (Lebrasseur et al, 2003) via un mécanisme dépendant du calcium (Canto et al, 2006). En outre, il a été montré une augmentation de l'expression d'ErbB3, un récepteur de la NRG1, lors d'un entraînement chronique de type renforcement musculaire (Lebrasseur et al, 2005). La NRG1 serait donc un acteur potentiel participant aux effets bénéfiques de l'exercice physique. Elle exercerait alors des fonctions hypertrophiques, neurotrophiques et stimulatrices de la régénération.

Compte tenu de l'ensemble de ces éléments, l'étude de la NRG1 dans un contexte de vieillissement musculaire apparaît très intéressante. Nous avons souhaité explorer deux hypothèses dans cette étude. D'une part, le vieillissement pourrait altérer la voie de la NRG1, au repos, dans le muscle sarcopénique ce qui expliquerait une partie des dysfonctions musculaires observées avec l'âge. D'autre part, le vieillissement pourrait altérer la capacité du muscle squelettique à libérer la NRG1 durant la contraction ce qui participerait à la moindre protéosynthèse observée suite à un exercice de renforcement musculaire chez certaines personnes âgées (Fry et al, 2011).

## 2 MATERIEL ET METHODES

### 2.1 PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Des rats âgés (n=5 ; 22 mois) et adultes (n= 6 ; 6 mois) ont été utilisés pour cette étude. Les animaux ont été soumis à un protocole d'électrostimulation sur des muscles fléchisseurs plantaires de l'une des deux pattes. Les rats ont été euthanasiés immédiatement après l'exercice et les muscles ont été prélevés en vue des analyses biochimiques. Les muscles de la patte non stimulée ont été utilisés comme contrôles.



SCHEMA DU PROTOCOLE EXPERIMENTAL : ELECTROSTIMULATION ET ANALYSE BIOCHIMIQUE POST-EXERCICE

## **2.2 MODELES EXPERIMENTAUX ET MESURES REALISEES**

Les détails techniques et méthodologiques relatifs aux animaux (p93) et à leur euthanasie (p99), à l'électrostimulation (p97) et enfin aux expérimentations biochimiques (p100) sont explicités dans la partie *MATERIEL ET METHODES* de ce manuscrit.

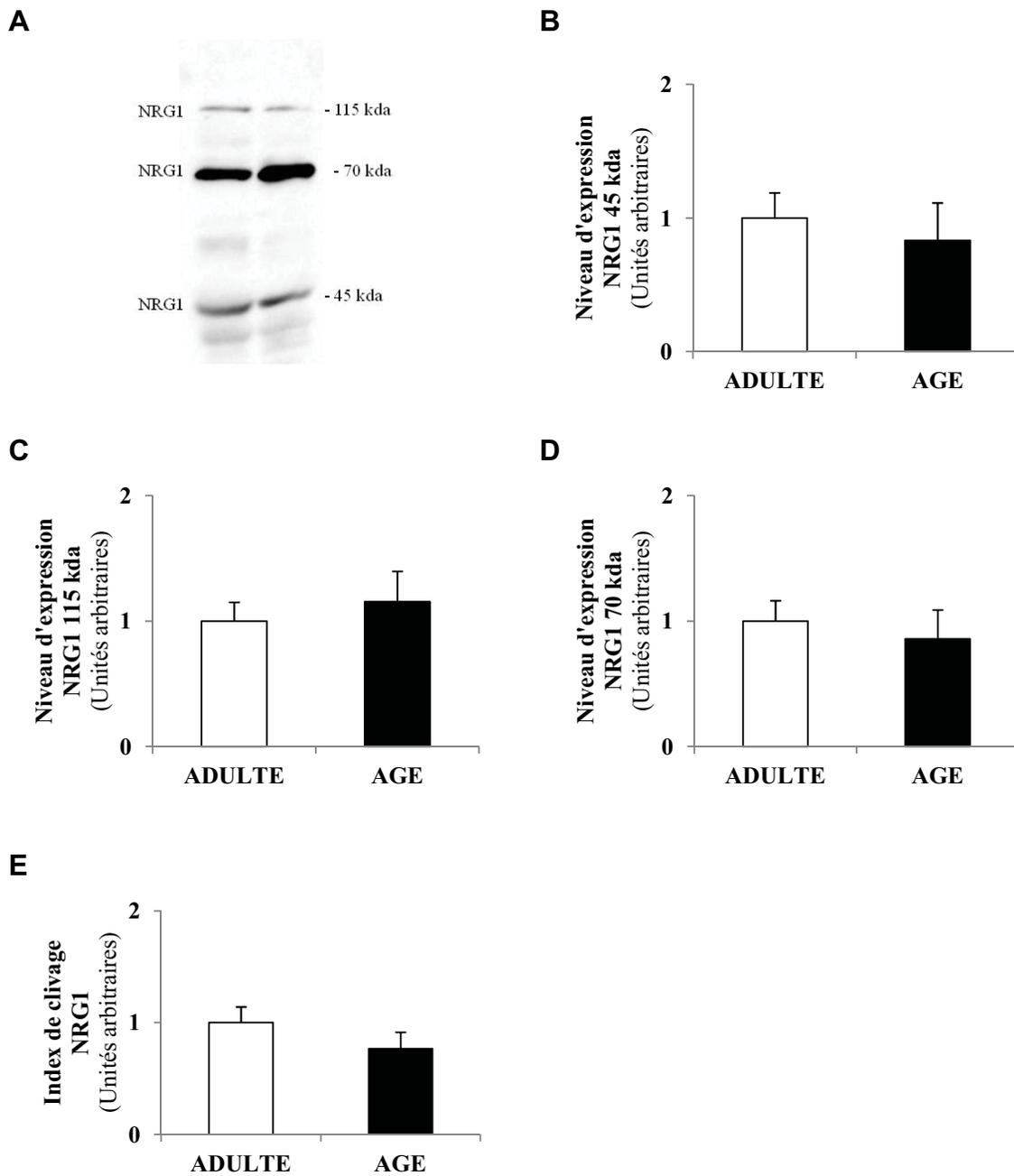
- L'indice de clivage de la NRG1 a été calculé selon la formule: Indice de clivage = forme 45kda / (forme 115 kda + forme 45 kda).
- L'indice de clivage a été calculé selon la formule: Indice de clivage = forme 80kda / (forme 180 kda + forme 80 kda).

## **3 RÉSULTATS**

Nous avons tout d'abord exploré l'effet de l'âge sur l'expression des protéines de la voie NRG1/ErbBs ainsi que le clivage de la NRG1 à l'état basal. Nous avons réalisé pour cela une analyse de l'expression de la NRG1 dans le muscle squelettique de rats adultes et âgés au repos (Fig.41).

### **3.1 EXPRESSION ET CLIVAGE DE LA NRG1 DANS LE MUSCLE SQUELETTIQUE AU REPOS**

Nous n'avons observé aucune variation significative ni de l'expression (Fig. 41; B-D), ni du clivage (Fig. 41; E) de la NRG1 dans le muscle squelettique avec l'âge.



**FIGURE 41: EXPRESSION DE LA NRG1 DANS LE MUSCLE SQUELETTIQUE (GASTROCNEMIEN) DE RATS ADULTES ET AGES.**

Les valeurs sont représentées comme suit : moyenne  $\pm$  SEM.

### 3.2 EXPRESSION ET ACTIVATION DES ERBB3 ET ERBB4 DANS LE MUSCLE SQUELETTIQUE AU REPOS

Ensuite, nous avons réalisé une analyse de l'expression des ErbB3 et ErbB4 dans le muscle squelettique de rats adultes et âgés (Fig.42). De même que pour la NRG1, aucune variation significative n'a été observée sur l'expression des récepteurs ErbB3 et ErbB4 (Fig. 42 ; B-C). Le niveau de phosphorylation basal de ces protéines était également similaire entre les deux groupes (Fig. 42 ; D-E).

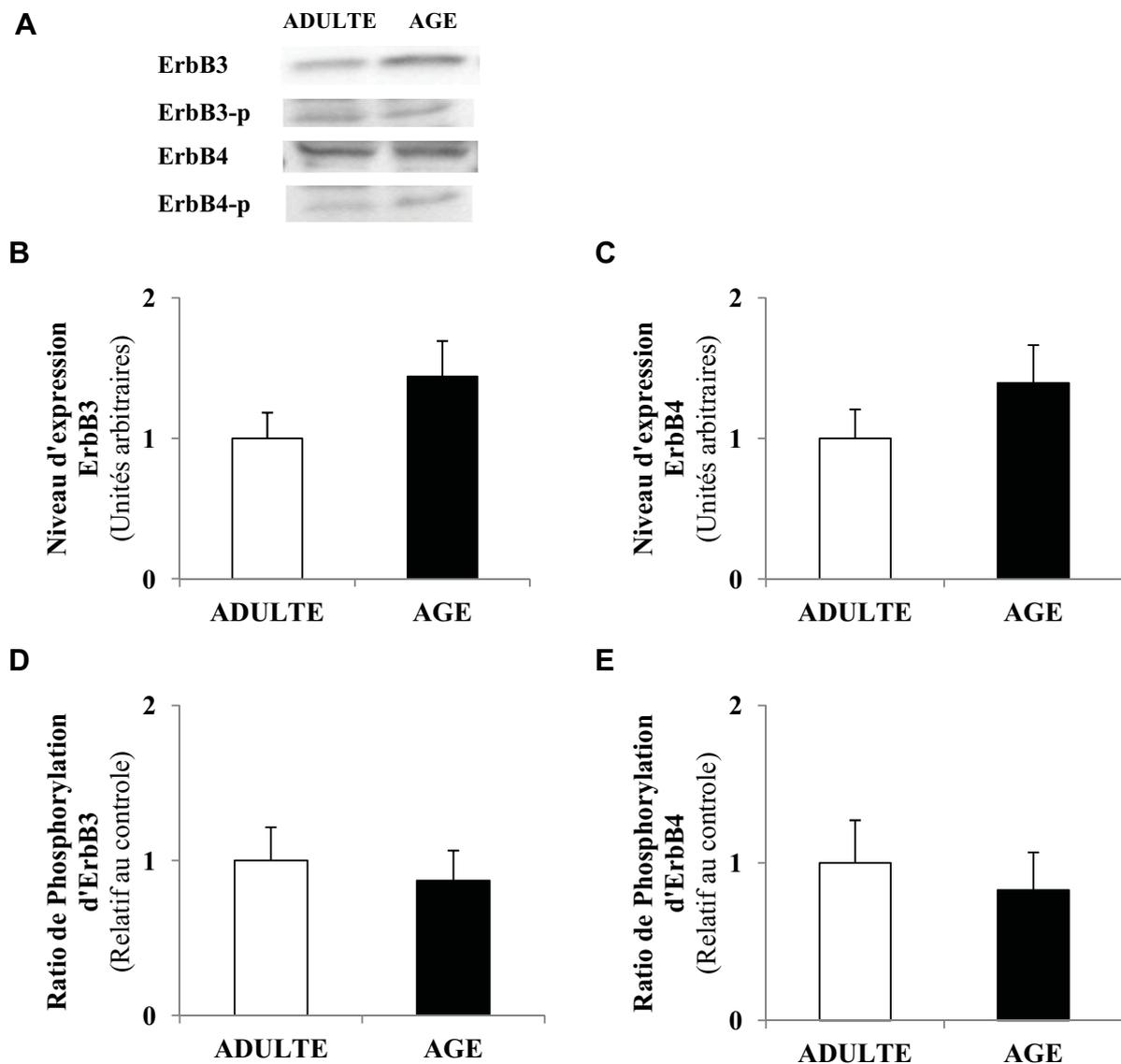


FIGURE 42:EXPRESSION ET RATIOS DE PHOSPHORYLATION DES ERBB3 ET ERBB4 DANS LE MUSCLE SQUELETTIQUE DE RATS ADULTES ET AGES.

Les valeurs sont représentées comme suit : moyennes ± SEM.

### 3.3 EFFET DE LA CONTRACTION MUSCULAIRE *IN VIVO* SUR LE CLIVAGE DE LA NRG1.

Nous n'avons pas observé ni d'effet âge, ni d'effet contraction sur le clivage de la NRG1 (Fig. 43 ; B). Compte tenu des publications antérieures (Lebrasseur et al, 2003 ; Canto et al, 2006), le clivage de la NRG1 par la contraction était l'un des éléments clé de nos hypothèses. Les résultats ci-dessous ont donc nécessité une réorientation scientifique de nos travaux d'étude.

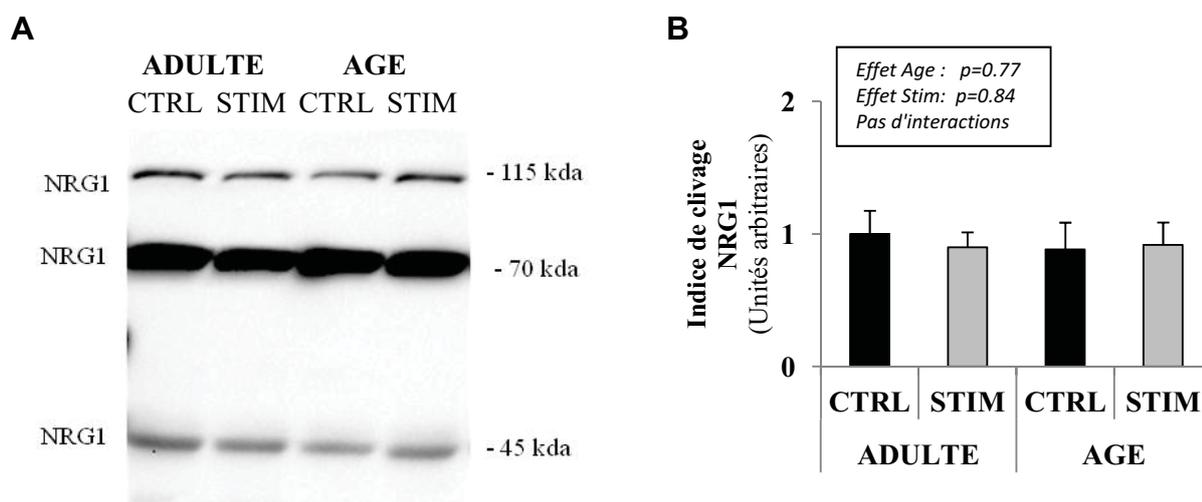


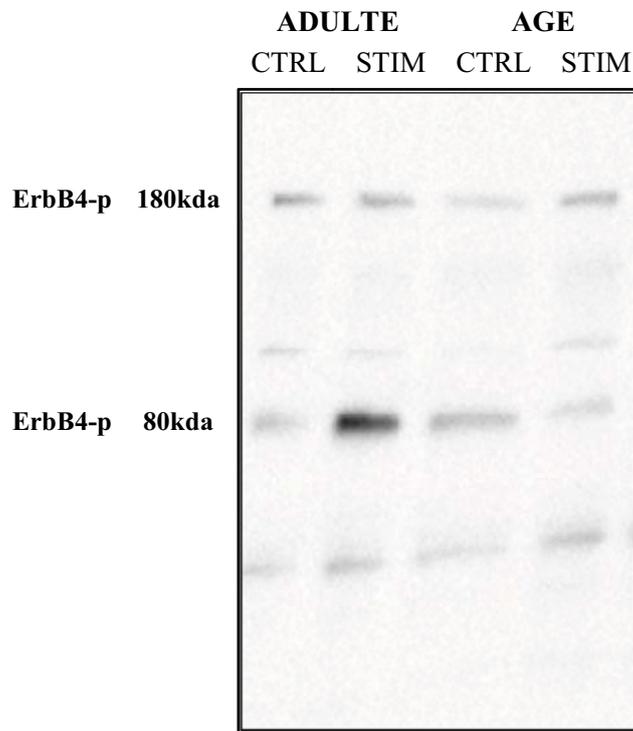
FIGURE 43: EFFET D'UN EXERCICE AIGUE SUR LE CLIVAGE DE LA NRG1 DANS LE MUSCLE SQUELETTIQUE (GASTROCNEMIEN) DE RATS ADULTES ET AGES.

Les valeurs sont représentées comme suit : moyennes  $\pm$  SEM.

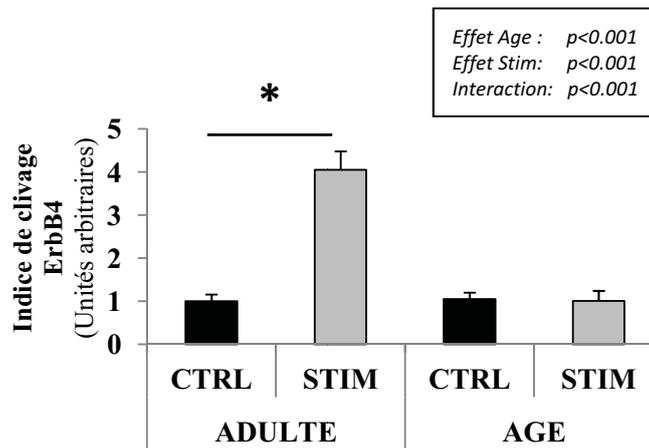
### **3.4 EFFET DE LA CONTRACTION MUSCULAIRE *IN VIVO* SUR L'ACTIVATION DES ERBBS.**

Lors des analyses biochimiques des échantillons de muscle squelettique électrostimulés de rats adultes et âgés, nous n'avons pas trouvé d'activation des récepteurs ErbBs au poids moléculaire de 180kda (Fig. 44 ; A). Cependant, nous avons observé un fragment d'ErbB4 fortement phosphorylé au poids moléculaire de 80 kda (Fig. 44 ; A). Nous avons donc calculé un indice de clivage de la forme phosphorylée d'ErbB4 sur le même principe celui du clivage de la NRG1 (Fig. 44 ; B). Nous avons observé une interaction entre effet âge et effet de la NRG1 sur l'apparition d'un fragment d'ErbB4 phosphorylé à 80kd. Nous avons donc réalisé un test post-hoc et le clivage d'ErbB4 n'était significatif que dans le groupe Adulte (Fig. 44 ; B). Le récepteur ErbB4 est le seul récepteur de cette famille de protéine à pouvoir libérer un fragment soluble dans le cytosol et ce fragment a été rapporté pour être de 80kda (Ni et al, 2001).

**A**



**B**



**FIGURE 44: EFFET D'UN EXERCICE AIGUE SUR LES RATIOS DE PHOSPHORYLATION D'ERBB4 DANS LE GASTROCNEMIEN DE RATS ADULTES ET AGES.**

Les valeurs sont représentées comme suit : moyennes  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ .

### 3.5 EFFET DU VIEILLISSEMENT SUR L'EXPRESSION MUSCULAIRE D'ADAM17.

Un clivage extracellulaire par la métalloprotéase TACE/ADAM17 a été montré comme nécessaire à la libération du fragment de 80kda au niveau intracellulaire (Rio et al, 2000). Nous avons donc exploré l'influence de l'âge sur l'expression de cette protéine dans le muscle squelettique.

L'expression d'ADAM17 s'est révélée significativement diminuée avec l'âge (Fig.45 ; B).

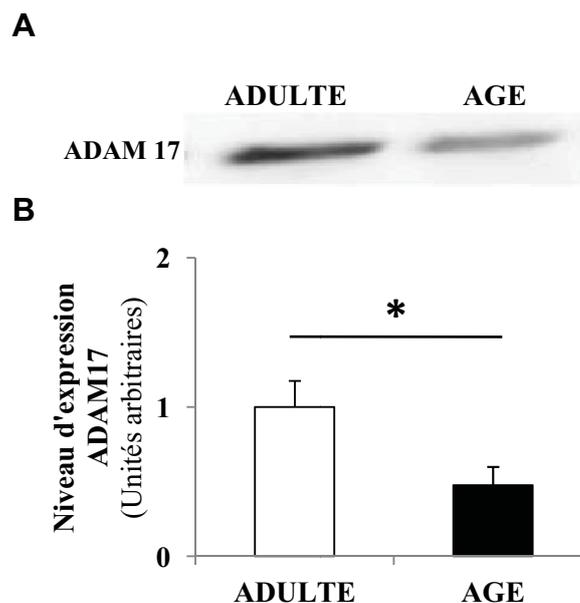


FIGURE 45:EXPRESSION D'ADAM17 DANS LE GASTROCNEMIEN DE RATS ADULTES ET AGES.

Les valeurs sont représentées comme suit : moyennes  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$

Toutefois, l'expression à elle seule d'une métalloprotéase ne donne qu'une information partielle de son activité protéolytique réelle. En effet, des protéines comme TIMP3 sont capable d'inhiber l'accès d'ADAM17 à son site de clivage (Le Gall et al, 2010).

### 3.6 EFFET DU VIEILLISSEMENT SUR L'EXPRESSION MUSCULAIRE DE TIMP3

Nous avons observé une augmentation significative de l'expression de TIMP3 dans le groupe AGE (Fig.46 ; B). En résumé, nous avons observé à la fois une réduction de la présence de la métalloprotéase ADAM17 (Fig.45) concomitante d'une augmentation de sa protéine inhibitrice TIMP3 (Fig. 46).

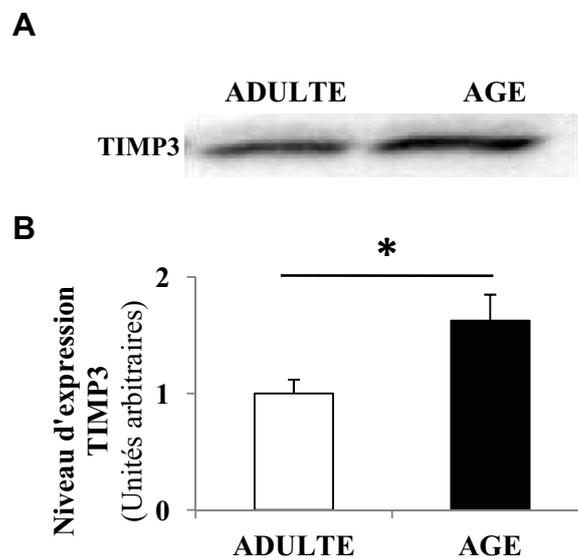


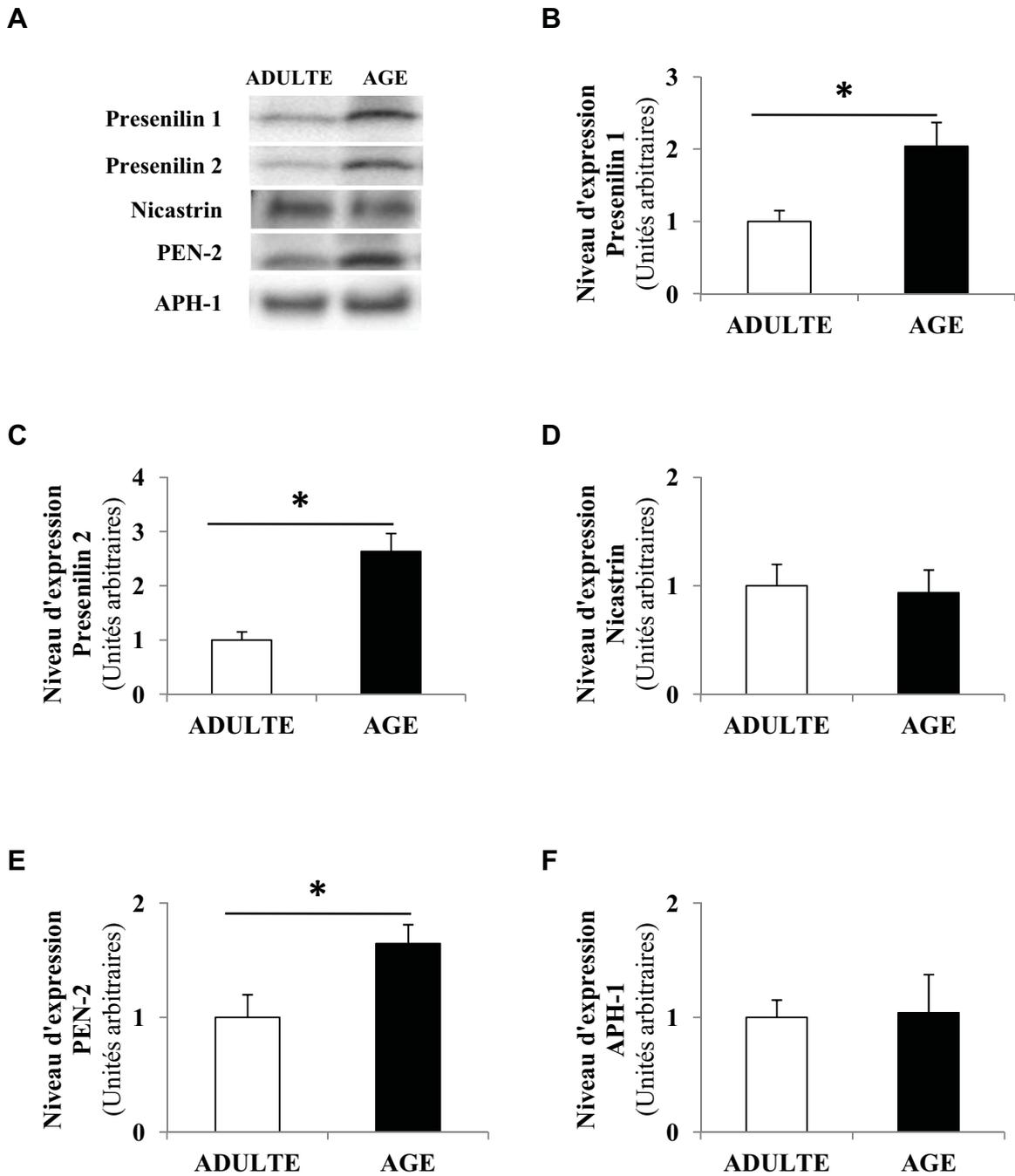
FIGURE 46:EXPRESSION DE TIMP3 DANS LE GASTROCNEMIEN DE RATS ADULTES ET AGES.

Les valeurs sont représentées comme suit : moyennes  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$

La libération du fragment intracellulaire d'ErbB4 nécessite l'intervention d'un autre complexe protéique au niveau cytosolique : le complexe  $\gamma$ -sécrétase (Ni et al, 2001). Afin de poursuivre notre investigation du processus de libération du fragment intracellulaire d'ErbB4, nous nous sommes donc intéressés à l'expression des différentes protéines du complexe  $\gamma$ -sécrétase.

### **3.7 EFFET DU VIEILLISSEMENT SUR L'EXPRESSION MUSCULAIRE DES $\gamma$ -SECRETASES.**

L'expression musculaire des différentes protéines du complexe  $\gamma$ -sécrétase est différentiellement affectée par le vieillissement (Fig. 47). Les protéines Nicastrin et APH-1 ne montrent pas de variation de leur expression avec l'âge dans le muscle squelettique (Fig. 47 ; D et F). A l'inverse, on observe une augmentation de l'expression des protéines Presenilin 1, Presenilin 2 et PEN-2 dans le muscle squelettique des rats âgés (Fig. 47 ; B, C et E).



**FIGURE 47:EXPRESSION DES PROTEINES DU COMPLEXE  $\gamma$ -SECRETASE DANS LE GASTROCNEMIEN DE RATS ADULTES ET AGES.**

Les valeurs sont représentées comme suit : moyennes  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$

## 4 DISCUSSION

La NRG1 est un facteur de croissance possédant des propriétés essentielles durant le développement cardiaque, nerveux et musculaire connues de longue date (Falls 2003). Cette protéine a également montré des fonctions dans la régénération du tissu musculaire et du tissu nerveux (Hirata et al, 2007 ; Fricker et al, 2011) ainsi que des propriétés hypertrophiques dans les cellules musculaires (Hellyer et al, 2006). Récemment, sur culture de cellules musculaires, il a aussi été rapporté une stimulation de la biogénèse mitochondriale permettant une augmentation de la sensibilité à l'insuline (Canto et al, 2007). L'ensemble de ces rôles semble très intéressant dans le contexte de la sarcopénie qui se caractérise justement par des atteintes de la trophicité musculaire, du système nerveux périphérique, de la capacité de régénération et de la fonction mitochondriale (Narici et Maffulli, 2010). Pourtant aucune donnée n'a été publiée, à notre connaissance, sur le lien entre NRG1 et vieillissement musculaire.

***Au repos, la voie NRG1/ErbB ne varie pas avec l'âge dans le muscle squelettique.***

Nous nous sommes donc posé la question de l'influence du vieillissement sur l'activité de la voie NRG1/ErbB dans le muscle squelettique. Or, la NRG1 est une protéine transmembranaire dont le fragment bioactif EGF est rendu soluble par clivage (Falls 2003). Nous avons donc analysé l'expression et le clivage de la NRG1 dans le muscle squelettique de rats adultes (6 mois) et âgés (22 mois). Nous avons détecté trois signaux reproductibles de NRG1 à 115kd, 70 kd et 45kd par western blot (Figure 41). Nous avons réalisé la quantification de l'ensemble de ces signaux que nous avons identifiés comme étant l'expression basale de NRG1.

La plupart des isoformes de NRG1 ont un poids moléculaire prédit d'environ 70kd (Uniprot.org). Toutefois, probablement du fait de mécanismes post-traductionnels, la plupart des publications rapportent un poids moléculaire de 90kd (Freese et al, 2009 ; Ritch et al, 2005) ou encore plus fréquemment de 115kd (Cote et al, 2005 ; Kuramochi et al, 2004 ; Livanainen et al, 2011 ; Lemmens et al, 2006 ; Hirata et al, 2007 ; Safa et al, 2011 ; Wang et al, 2001) lors des analyses par western blot. Ces signaux sont alors associés aux formes totales de la NRG1 dites pro-NRG1. Certains

auteurs ont également détecté des bandes à 130kd (Wang et al, 2001 ; Marballi et al, 2012) mais il semble que celle-ci représente la forme totale de la NRG1 de type 3 possédant le domaine CRD (cf. Fig. 4 ; p13).

La question du signal à 70kd est plus débattue, certains auteurs décrivent cette bande comme étant la forme clivée de la NRG1 de type 3 (Wang et al, 2001 ; Marballi et al, 2012 ; Fleck et al, 2013) ou d'une forme à 90kd (Ritch et al, 2005). A contrario, dans des cellules transfectées, la bande à 70kd s'est aussi révélée être la forme totale de la NRG1 de type 1 (Luo et al, 2011). A l'heure actuelle il est donc encore difficile de conclure sur la nature réelle de ce signal à 70kd.

A l'inverse, dès les premières publications dans les années 1990, le fragment soluble de la NRG1, capable d'activer les récepteurs ErbBs, a été détecté à 40-45kd (Peles et al, 1992 ; Falls et al, 1990). De plus, un certain nombre de publications ont identifié ce fragment comme étant la résultante du clivage de la forme à 115kd (Wang et al, 2001 ; Kuramochi et al, 2004). Enfin, une forme d'environ 40kd de la NRG1 est retrouvée au niveau plasmatique (Moondra et al, 2009).

Compte tenu de ces éléments, nous avons déterminé un indice de clivage au moyen des fragments 115kd et 45kd. Toutefois, nous n'avons observé aucun effet de l'âge sur l'expression de la NRG1 ou sur son indice de clivage (Fig. 41). Nos résultats semblent donc indiquer qu'à l'état basal la voie NRG1/ErbB n'est pas modulée chez le rat âgé au niveau du gastrocnémien.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons également analysé l'expression et l'activation des récepteurs ErbB3 et ErbB4 (Fig. 42). L'activation de ces deux récepteurs par la NRG1 dans le muscle squelettique a été démontré à plusieurs reprises (Suarez et al, 2001 ; Lebrasseur et al, 2003 ; Canto et al, 2004 ; Lebrasseur et al, 2005 ; Hellyer et al, 2006 ; Canto et al, 2006). Toutefois, nous n'avons trouvé aucune augmentation ni de l'expression (Figure 42, B et C) ni de l'activation (Fig. 42, D et E) de ces deux récepteurs dans le muscle squelettique des rats âgés.

L'ensemble de ces résultats nous permet de conclure à une absence d'effet du vieillissement sur la voie NRG1/ErbB au repos. Toutefois, une limitation de notre étude était une atteinte pathologique modérée. En effet, le modèle animal de vieillissement utilisé pour notre étude correspond à un âge humain d'environ 60 ans

(Andreollo et al, 2012) ce qui marque le début du processus. Il est possible qu'un âge plus avancé puisse être à même de moduler la signalétique NRG1/ErbB au repos.

### ***Clivage de la NRG1 lors de la contraction musculaire.***

Les activités protéolytiques agissant sur la pro-NRG1 peuvent être régulées positivement et provoquer l'effusion de NRG1 solubles lors d'un stress physiologique (Diaz-Rodriguez et al, 2000). L'exercice physique figure parmi les stimuli à même d'induire un clivage de la NRG1 et une phosphorylation consécutive de ses récepteurs (Lebrasseur et al, 2003). Le mécanisme a été étudié *in vitro* et serait lié à la libération de calcium au niveau intracellulaire (Canto et al, 2006) ou au stress mécanique (Ennequin et al, 2015). De plus, l'exercice chronique en résistance est capable d'augmenter l'expression du récepteur ErbB3 chez l'homme (Lebrasseur et al, 2005). Notre équipe a également confirmé la capacité de l'exercice chronique à moduler la voie de la NRG1 chez des rats rendus obèses (Ennequin et al, 2015). En effet, chez les rats soumis à un entraînement en endurance, nous avons observé une augmentation du clivage de la NRG1 associée à une augmentation de l'activité de la métalloprotéase ADAM17.

Or, le vieillissement est caractérisé par une moindre réponse aux stimuli anaboliques (Fry et al. 2011 ; Guillet et al. 2004) ainsi qu'une moindre capacité de régénération des fibres musculaires et des JNM (Li et al. 2011 ; Fry et al. 2015). Le potentiel neurotrophique et myogénique de la NRG1 étant dépendant de son clivage protéolytique, nous avons donc émis l'hypothèse que le vieillissement pourrait inhiber le clivage de la NRG1 induit par l'exercice physique. Nous avons donc soumis des rats adultes et âgés à un protocole d'électrostimulation comme modèle d'exercice de renforcement musculaire.

Nous avons été surpris de ne constater aucun clivage de la NRG1 induit par l'activité contractile chez les rats adultes (Figure 44), ce qui est en désaccord avec les précédentes publications sur le sujet (Canto et al, 2006 ; Lebrasseur et al, 2003). Le postulat de départ étant un clivage de la NRG1 induit par la contraction, nous avons procédé à un grand nombre de vérifications en laboratoire.

Nous avons tout d'abord testé plusieurs types de protocole d'exercice en plus de l'électrostimulation, nous avons soumis des rats à des sessions d'exercice en endurance et de renforcement musculaire (Dispositif développé au laboratoire ; Lac et Cavalie, 1999). Aucune des ces modalités d'exercice n'a produit de clivage de la NRG1. Toutefois, Lebrasseur et al (2003) avaient présenté des résultats légèrement divergents selon les types musculaires (EDL, Soleus) avec notamment une expression nettement supérieure d'ErbB3 dans l'EDL. Dans un second temps, nous avons donc procédé aux mêmes analyses sur différents types de muscles ayant tous été sollicités durant les sessions d'exercice (EDL, Gastrocnémien, soleus, tibialis, vastus lateralis). Enfin, nous avons exploré la piste biochimique et avons testé six anticorps différents sur nos échantillons, en choisissant des cibles moléculaires de la protéine différentes pour chaque anticorps.

Compte tenu de l'étendue des travaux réalisés sans parvenir à obtenir un clivage de la NRG1 liée à la contraction, nous avons entamé un échange scientifique avec l'équipe ayant publié ces résultats (Lebrasseur et al, 2003). Il nous a été confirmé la difficulté à reproduire ces résultats.

En effet, après obtention de nos résultats, nous avons été intrigués par l'observation d'une forme protéique à 185kd dans l'étude de Lebrasseur et al (2003), celle la même qui serait clivée pour libérer le fragment soluble. Or, comme nous l'avons précisé la plupart des études rapportent un poids moléculaire de 115kd pour la forme totale (Hirata et al, 2007 ; Kuramochi et al, 2004 ; Lemmens et al, 2011). En outre, la plupart des isoformes ont un poids moléculaire prédit d'environ 70kd (Uniprot.org), aussi même si de nombreuses modifications post-traductionnelles sont possibles il paraît peu probable d'atteindre le poids de 185kd. Egalement, l'un des signaux désigné comme une forme clivée, dont l'augmentation attestait de l'effet contractile, était désignée à 115kd.

De notre point de vue, les résultats de Lebrasseur et al. (2003) sont le produit d'une erreur méthodologique et il n'y a pas de clivage de la NRG1 au niveau musculaire selon le modèle présenté. Nous sommes confortés en cela par la publication plus récente de cette même équipe (Lebrasseur et al, 2005), puisque le profil biochimique de la NRG1 ne montre plus une forme de haut poids moléculaire à 185kd mais a 110kd.

La deuxième publication à avoir montré un effet aigu de la contraction est celle de Canto et al (2006) qui décrit un clivage de la NRG1 dépendant de la libération de calcium intracellulaire dans des strips de muscles *ex vivo* de très jeunes rats (2 mois). Cependant, ceci a été obtenu par incubation des muscles au moyen de caféine, aucune donnée directe entre contraction et clivage de la NRG1 n'est fournie dans la publication. Par ailleurs, la NRG1 active ErbB3 dans cette étude mais pas la contraction musculaire ce qui semble suggérer un mécanisme d'activation différent.

#### ***La contraction musculaire induit un clivage d'ErbB4.***

Notre hypothèse initiale était une moindre activation de la voie NRG1/ErbB par la contraction musculaire chez les rats âgés. Nous avons donc analysé la phosphorylation des récepteurs ErbBs suite à la contraction musculaire (Figure 44). Ce faisant, nous avons obtenu un résultat relativement inattendu dans le muscle squelettique. En effet, malgré une absence de clivage de la NRG1 nous avons observé un effet de la contraction sur ErbB4 (Figure 44 ; A).

En effet, nous avons observé un signal de phosphorylation à 80kd au lieu des 180kd attendu (Figure 44). Si ce type de signaux n'avait jamais été observé auparavant au niveau du muscle squelettique, il est bien connu dans d'autres types de tissu. En effet, ErbB4 peut subir un double clivage extra puis intracellulaire et libérer son extrémité C-terminale au niveau cytoplasmique (Sanderson et al, 2006). Ce fragment soluble cytoplasmique (ICD) a été largement décrit à un poids moléculaire d'environ 80kd qui peut agir directement au niveau nucléaire comme une protéine chaperonne (Ni et al, 2001 ; Komuro et al, 2003 ; Williams et al, 2004). La contraction musculaire serait donc à même d'induire un clivage du récepteur ErbB4, indépendamment de la libération de NRG1, et de moduler par ce biais l'activité transcriptionnelle comme cela a été montré pour d'autres mécanismes (Higa-Nakamine et al, 2012). De plus, après traitement des échantillons avec le peptide immunogène pour ErbB4, nous avons observé une extinction du signal en western blot. Combiné au fait que le poids moléculaire correspond à celui décrit dans la littérature, cela nous renforce dans l'hypothèse que le signal visualisé correspond bien à la forme clivée de l'ErbB4

Les rôles physiologiques de l'ICD d'ErbB4 restent encore largement à élucider et à ce jour pratiquement aucune donnée n'est disponible sur le muscle squelettique. Une seule étude s'est intéressé à ce thème et a révélé que la forme non clivable, JM-a, est très majoritaire dans ce tissu (Veikkolainen et al, 2011).

Nous savons que l'adressage nucléaire de l'ICD d'ErbB4 a été rapportée pour permettre son association avec d'autres facteurs de transcription tels qu'ER $\alpha$  et Stat5, ou des corégulateurs transcriptionnels comme YAP, WWOX, ETO2, le complexe TAB2/N-CoR et les ubiquitine ligases Itch et Mdm2 (Wong et Weickert, 2009 ; Williams et al, 2004 ; Aqeilan et al, 2005 ; Sardi et al, 2006 ; Linggi et al, 2006 ; Omerovic et al, 2007; Arasada et Carpenter, 2005). Cette activité transcriptionnelle d'ErbB4 joue un rôle dans l'astrogénèse (Sardi et al, 2006), la différenciation des cellules mammaires (Jones et al, 2008), la maturation des oligodendrocytes (Lai et al, 2004) ou encore la régulation de l'activité de p53 (Arasada et Carpenter, 2005). Une étude a également rapporté la présence de ce fragment au niveau mitochondrial (Naresh et al, 2006), ce qui laisse supposer de potentiels rôles dans le métabolisme énergétique.

A ce stade, il est toutefois difficile de transposer l'ensemble de ces résultats à la physiologie musculaire pour en déduire le rôle du clivage d'ErbB4 que nous avons observé.

Cependant, les tissus et différentes lignées cellulaires de cancer semblent exprimer principalement les isoformes d'ErbB4 clivables (Veikkolainen et al, 2011). En outre, un anticorps monoclonal mAb 1479, qui cible spécifiquement une isoforme de la forme clivable JMa-ErbB4, a été montré comme supprimant la croissance de cellules de cancer du sein *in vitro* (Hollmén et al, 2009). L'ensemble de ces données supporte un rôle de l'ICD d'ErbB4 dans la prolifération et/ou la survie cellulaire.

L'exercice physique est un stimulus à même d'induire un processus régénératif nécessitant une prolifération cellulaire, notamment dans les cellules satellites. Or, Liu et al (2010) ont observé que TIMP3 était un régulateur négatif de la myogenèse dans des cellules C2C12 (Liu et al, 2010). Nous émettons donc l'hypothèse que l'inhibition liée à l'âge du clivage d'ErbB4 pourrait être impliquée dans la baisse de la capacité régénérative observée dans le muscle âgé (Li et al, 2011).

### ***Effet du vieillissement sur le clivage d'ErbB4 durant la contraction.***

Outre notre observation de l'apparition d'un fragment d'ErbB4 à 80kd chez les rats adultes, nous avons également observé un effet âge sur ce processus (Figure 44). L'indice de clivage d'ErbB4 n'a pas montré de modification chez les rats âgés (Figure 44 ; B). Bien que notre hypothèse de départ ciblant la NRG1 se soit révélée inexacte, le processus de vieillissement semble bel et bien altérer l'effet de la contraction musculaire sur ErbB4.

Afin de comprendre l'origine de cette altération liée à l'âge, nous avons exploré les protéines associées au mécanisme de clivage de l'ErbB4. Au niveau extracellulaire il a été montré l'implication d'ADAM17 et, au niveau intracellulaire, celle du complexe  $\gamma$ -sécrétase (Sanderson et al, 2006).

### ***Effet du vieillissement sur l'expression et la fonction d'ADAM17 dans le muscle squelettique au repos.***

Nous avons quantifié l'expression d'ADAM17 dans le muscle squelettique de rats adultes et âgés au repos (Figure 45). Cette exploration a révélé une diminution de l'expression d'ADAM17 chez les rats âgés (Figure 45 ; B). Cette observation constitue un premier élément explicatif pour la diminution de clivage d'ErbB4 chez les rats âgés. Toutefois, la diminution de l'expression d'ADAM17 n'était que d'environ 50% avec l'âge (Figure 45 ; B). Or, le clivage d'ErbB4 était totalement absent dans le groupe âgé. Nous avons donc émis l'hypothèse qu'un ou plusieurs autres facteurs complémentaires seraient à l'origine de l'abrogation complète du clivage d'ErbB4.

Compte tenu du processus de double clivage nécessaire à la libération du fragment cytosolique d'ErbB4, nous avons envisagé deux possibilités. Tout d'abord, une modulation par l'âge de facteurs régulant l'activité protéolytique d'ADAM17. Deuxièmement, le complexe  $\gamma$ -sécrétases responsable du clivage intracellulaire pourrait lui aussi être affecté par le vieillissement.

La protéine TIMP3 est un inhibiteur endogène des métalloprotéases de la famille ADAM, son extrémité N-terminale est capable de former un complexe avec le domaine catalytique d'ADAM17 (Wisniewska et al, 2008). De plus, la régulation de TACE par TIMP3 semble impliquée dans le développement de

l'insulino-résistance musculaire (Monroy et al, 2009) qui est un des facteurs d'atrophie musculaire avec l'âge.

Nous avons donc quantifié l'expression de TIMP3 dans les muscles des rats âgés et adultes (Figure 46). Nos résultats ont montré une augmentation de près de 60% de TIMP3 (Figure 46 ; B). Cette augmentation de TIMP3, associée à la diminution d'ADAM17 et pourrait expliquer l'absence de clivage d'ErbB4 chez les rats âgés. Ce type d'effet de l'âge a déjà été rapporté pour TIMP3. En effet, l'expression de TIMP3 après un trauma cérébral n'augmente que chez des souris âgées comparativement à des souris adultes (Sandhir et al, 2014). Toutefois, TIMP3 est un facteur anti-inflammatoire dont la hausse de l'expression est observée suite à une restriction calorique dont les effets positifs sont maintenant bien connus (Swindell et al, 2009).

#### ***L'activité d'ADAM 17 pourrait être un facteur limitant du clivage d'ErbB4.***

Afin de compléter notre investigation de la modulation du mécanisme de clivage d'ErbB4, nous avons également étudié les  $\gamma$ -sécrétases responsables du clivage intracellulaire d'ErbB4 (Ni et al, 2001). Contrairement à ce que nous pouvions attendre, nous n'avons observé aucune diminution de l'expression des protéines du complexe  $\gamma$ -sécrétase (Figure 7). A contrario, nous avons même observé une augmentation de la présence des Presenilin 1 et 2 ainsi que de la PEN-2 (Figure 7 ; B, C et E). L'expression des  $\gamma$ -sécrétases n'avait jamais été investiguée dans le muscle âgé mais une telle surexpression a été observée dans le muscle de patients atteints de myosite sporadique à inclusions, une myopathie acquise d'apparition très tardive (Nogalska et al, 2012). Cette hausse de l'expression de certaines  $\gamma$ -sécrétases pourrait donc avoir, soit un rôle délétère sur le muscle âgé indépendamment de toute interaction avec la voie NRG1/ErbB, soit un rôle compensatoire lié à la baisse de l'activité d'ADAM17.

Nos résultats suggèrent donc que, chez le rat âgé, le clivage d'ErbB4 induit par la contraction semble limité par l'activité musculaire d'ADAM17. Notre étude suggère également que l'activité des  $\gamma$ -sécrétases serait dépendante de l'action préalable d'ADAM17 sur ErbB4. Cependant cette hypothèse est remise en question par une étude récente montrant une indépendance des

deux phénomènes au cours de la différenciation de cellules pulmonaires (Fiaturi et al, 2014). D'autres études sont donc nécessaires pour statuer sur ce mécanisme et déterminer en particulier la variabilité inter-tissulaire.

## **Conclusion**

Cette étude a montré qu'une contraction musculaire *in vivo* chez le rat n'induit pas de clivage de la NRG1 et cela contrairement aux études antérieures (Canto et al, 2006 ; Lebrasseur et al, 2003). Cependant, nous avons observé un clivage d'ErbB4 suite au protocole d'électrostimulation. De plus, le fragment détecté correspondait, par son poids moléculaire, au produit d'un mécanisme de solubilisation du domaine intracellulaire d'ErbB4 d'ores et déjà décrit dans la littérature.

Parallèlement à cette observation, nous avons également montré que le vieillissement bloque la libération de ce fragment. L'exploration du mécanisme nous a permis de révéler que la baisse de l'activité d'ADAM17, responsable du clivage extracellulaire, est possiblement responsable de ce phénomène.

Toutefois, aucune étude n'a été réalisée jusqu'alors sur ce mécanisme au niveau du muscle squelettique et nous ne pouvons donc qu'émettre des hypothèses sur le rôle joué par le fragment ICD d'ErbB4 dans ce tissu.

Les résultats de notre équipe tendent finalement à montrer une réponse différente des protéines de la voie NRG1/ErbB selon si l'exercice est aigu ou chronique. Tandis qu'un entraînement chronique augmente le clivage au repos de la NRG1 (Ennequin et al, 2015), l'exercice aigu pourrait agir sur l'activité transcriptionnelle directement via la solubilisation cytosolique de l'ICD d'ErbB4.

Les résultats obtenus dans cette étude posent de nombreuses questions et nécessiteront de futures expérimentations visant à définir précisément le rôle de ce fragment d'ErbB4 dans le muscle squelettique. Ces études permettront de comprendre également les conséquences de l'incapacité du muscle âgé à réaliser ce clivage suite à une série de contractions.



---

# ETUDE 3 : EFFET DU VIEILLISSEMENT SUR LA SIGNALÉTIQUE CELLULAIRE DE LA NRG1 AU NIVEAU CARDIAQUE.

# 1 INTRODUCTION

La prévalence des maladies cardiovasculaires présente une augmentation spectaculaire avec l'âge chez les hommes comme chez les femmes (Roger et al, 2011). On observe une hypertrophie des cardiomyocytes âgés (Olivetti et al, 1991) à l'origine d'une augmentation significative de l'épaisseur du myocarde (Gerstenblith et al, 1977). La diminution de la fonction cardiaque est un facteur majeur de la diminution des capacités physiques et participe donc au déclin progressif du  $VO_2\text{max}$  chez la personne âgée (Fleg et al, 1988).

Or, il a été montré une corrélation positive entre le  $VO_2\text{max}$  et les taux plasmatiques de NRG1 (Moondra et al, 2009). De plus, l'administration de NRG1 présente un intérêt clinique grandissant dans le champ des pathologies cardiovasculaires comme en témoigne les récentes parutions dans de prestigieuses revues internationales (Yutzey 2015 ; Parodi et Kuhn, 2014). Toutefois, malgré ces constats convergents, le rôle de la NRG1 dans le vieillissement cardiaque n'est évoqué que dans une seule publication (Rohrbach, Niemann et al, 2006) et n'a fait l'objet d'aucuns travaux expérimentaux publiés.

Pourtant, au niveau cellulaire, on observe une homologie robuste entre rôles cardiaques de la NRG1 et atteintes cardiaques liées au vieillissement. En effet, la recapture du  $Ca^{2+}$  ainsi que son stockage dans le réticulum sarcoplasmique (RS) sont diminués au cours du vieillissement cardiaque (Dai et al, 2009 ; Loffredo et al, 2014). Or, la NRG1 permet une levée d'inhibition de la pompe SERCA, du réticulum, et ainsi une amélioration de la recapture du  $Ca^{2+}$  pendant la diastole (Brero et al, 2010). De même, il a été observé une hausse des processus apoptotiques dans le muscle cardiaque âgé (Bernecker et al, 2003) tandis que la NRG1 a montré sa capacité à inhiber l'apoptose induite par le stress oxydant ou les anthracyclines (Kuramochi et al, 2004 ; Fukazawa et al, 2003).

Autre exemple, certains chercheurs affirment que le taux de renouvellement des cardiomyocytes diminue progressivement avec le vieillissement (Bergmann et al, 2009). Cette altération constituerait donc une autre cible pour la NRG1 qui est capable d'induire une prolifération cellulaire et ainsi la régénération du tissu cardiaque (Bersell et al, 2009).

Enfin, des facteurs de régulation de cette voie sont également impliqués dans les phénomènes physiopathologiques cardiaques couramment observés dans le vieillissement. En effet, l'expression de protéines comme ERRF1 ou Erbin, régulant respectivement la fonction d'ErbB1 et ErbB2, est corrélée négativement à l'hypertrophie cardiaque (Rachmin et al, 2014 ; Cai et al, 2009).

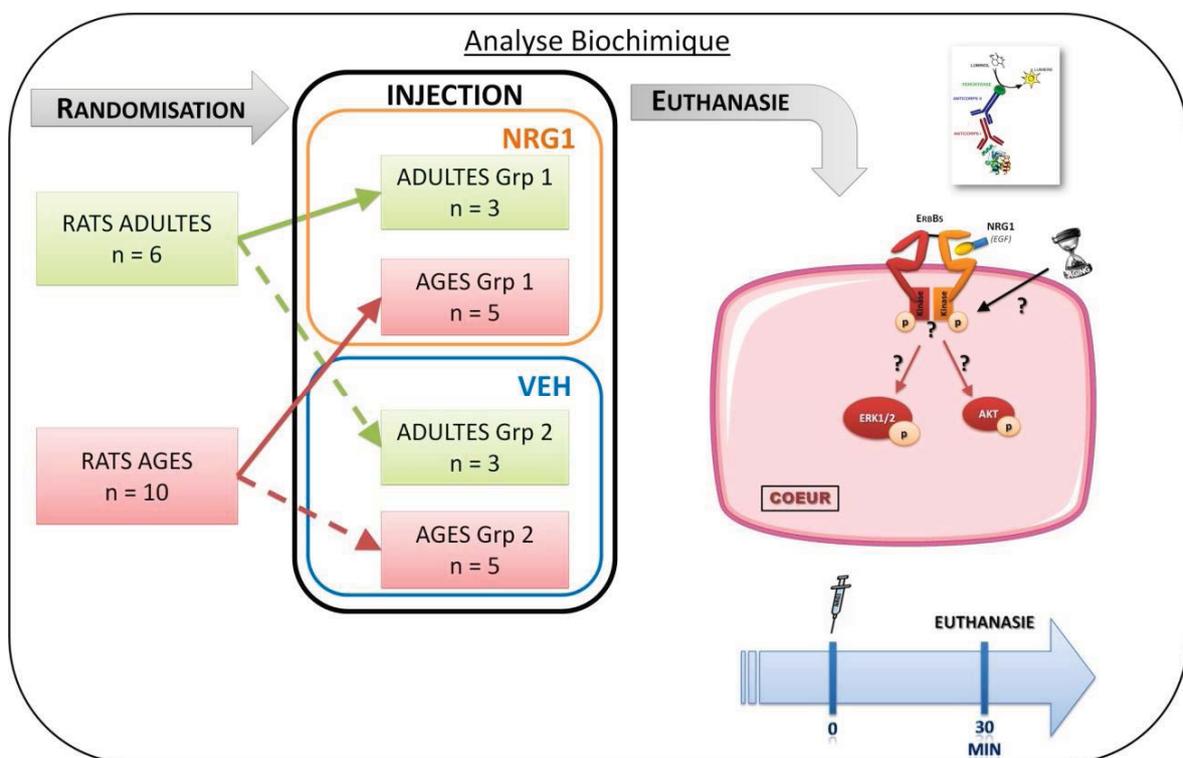
Le potentiel thérapeutique *in vivo* de la NRG1 chez des animaux âgés semble donc prometteur compte tenu de ces données. Par ailleurs, des résultats positifs ont été obtenus sur des modèles animaux avec insuffisance cardiaque (Li et al, 2011) ou même chez l'homme (Jabbour et al, 2011). Toutefois, un autre angle de vue s'avère potentiellement intéressant. En effet, on observe une augmentation de la phosphorylation d'ErbB4 sur un modèle animal d'ischémie-reperfusion (Lemmens et al, 2011). A l'inverse de cet effet en aigu, on observe une déficience d'activation du récepteur ErbB4 dans le ventricule droit de souris diabétiques de type 2 (Doggen et al, 2009). Certains auteurs ont donc suggéré un modèle chronologique de réponse de la voie NRG1/ErbB lors d'une perturbation de l'homéostasie cardiaque. La voie NRG1/ErbB se révélerait protectrice lors d'un stress aigu mais, lorsque le stress serait chronique, l'inhibition de cette voie deviendrait l'un des facteurs d'aggravation de la pathologie cardiaque sous jacente (Lemmens et al, 2007).

Du fait des perturbations observées au niveau cardiaque, ce modèle nous a permis d'avancer l'hypothèse d'un potentiel effet de l'âge sur la voie NRG1/ErbB. En outre, le type de modulations induites par le vieillissement pourrait avoir des conséquences sur le potentiel thérapeutique de la NRG1 exogène ou endogène. Aussi, nous avons donc exploré dans un premier temps l'effet du vieillissement sur la voie NRG1/ErbB dans le cœur de rats adultes et âgés. Ensuite, dans une perspective plus pharmacologique, nous avons voulu savoir si le vieillissement altérerait la capacité de la NRG1 à activer ses signaux intracellulaires dans le tissu cardiaque.

## 2 METHODOLOGIE

### 2.1 PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Des rats âgés (n=10 ; 22 mois) et adultes (n= 6 ; 6 mois) ont été utilisés pour cette étude. Les deux groupes de rats (ADULTES, AGES) ont été subdivisé en 4 sous groupes (VEH AGES, VEH ADULTES, NRG1 AGES, NRG1ADULTES) en vue d'une injection de NRG1 ou de VEH (solution saline). 30 min après l'injection de NRG1, les animaux ont été euthanasiés et le cœur a été prélevé en vue des analyses biochimiques.



SCHEMA DU PROTOCOLE EXPERIMENTAL : ANALYSE BIOCHIMIQUE POST INJECTION DE NRG1

### 2.2 MODELES EXPERIMENTAUX ET MESURES REALISEES

Les détails techniques et méthodologiques relatifs aux animaux (p93) et à leur euthanasie (p99), aux injections de NRG1 (p99) et enfin aux expérimentations biochimiques (p100) peuvent être trouvés dans la partie *MATERIEL ET METHODES* de ce manuscrit.

### 3 RÉSULTATS

#### 3.1 EXPRESSION BASALE DES RECEPTEURS ERBBS DANS LE CŒUR

Dans un premier temps, nous avons analysé l'expression des récepteurs à la NRG1 par western blot. Aucun effet âge n'a été observé sur l'expression des ErbBs dans le muscle cardiaque de nos animaux (Fig.48).

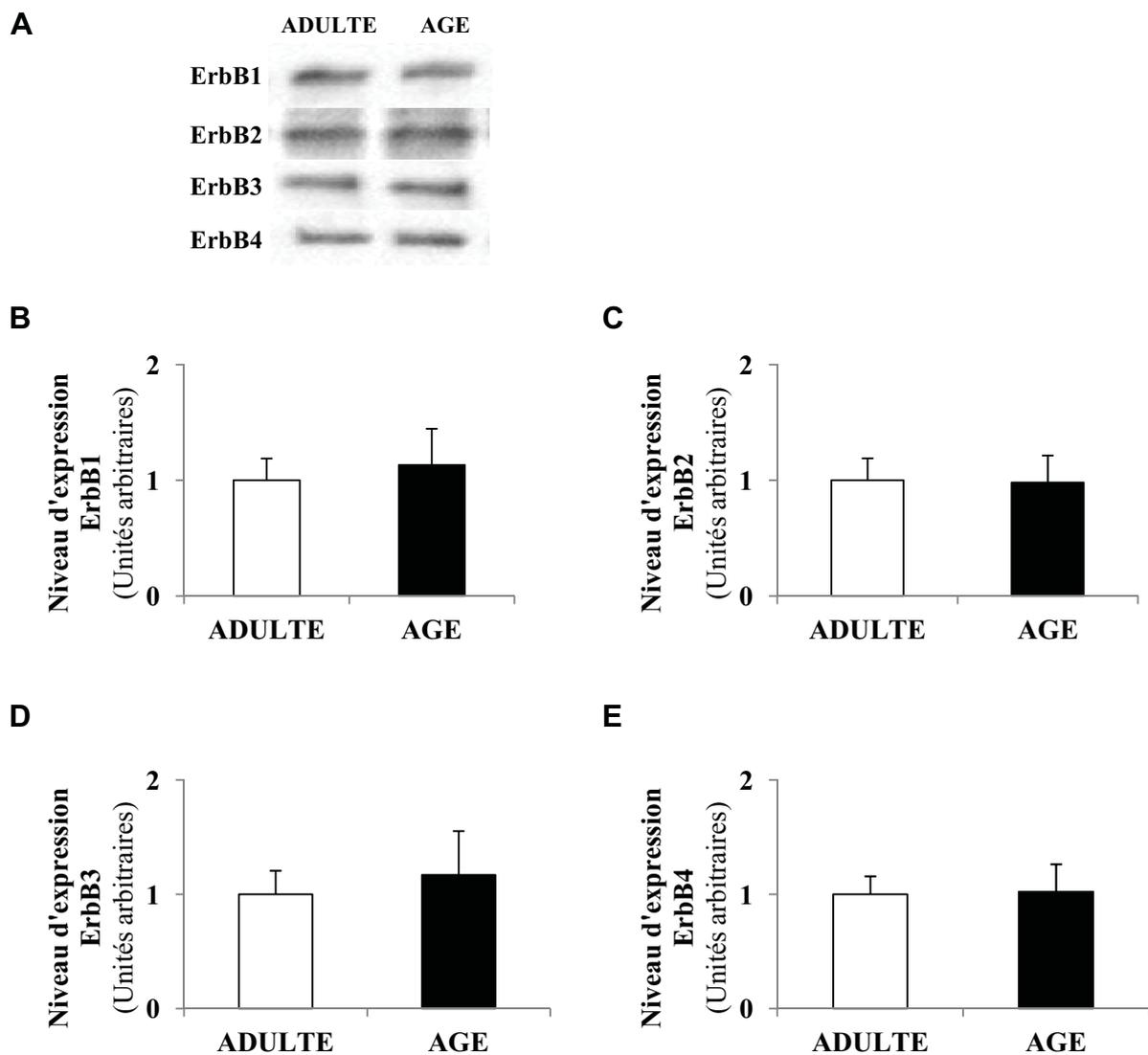


FIGURE 48: EXPRESSION BASALE DES ERBBS DANS LE CŒUR DE RATS ADULTES ET AGES.

Les valeurs sont représentées comme suit : moyennes  $\pm$  SEM.

### 3.2 EXPRESSION ET ACTIVATION DES PROTEINES REGULATRICES DE LA FONCTION DES ERBBS

Les niveaux d'expression de ERRF1, TOB1, Erbin et EBP1 se sont révélés similaires quelque soit l'âge (Figure 49 ; C-F). Aucun effet vieillissement n'a été observé sur le ratio de phosphorylation de TOB1 (Figure 49 ; B).

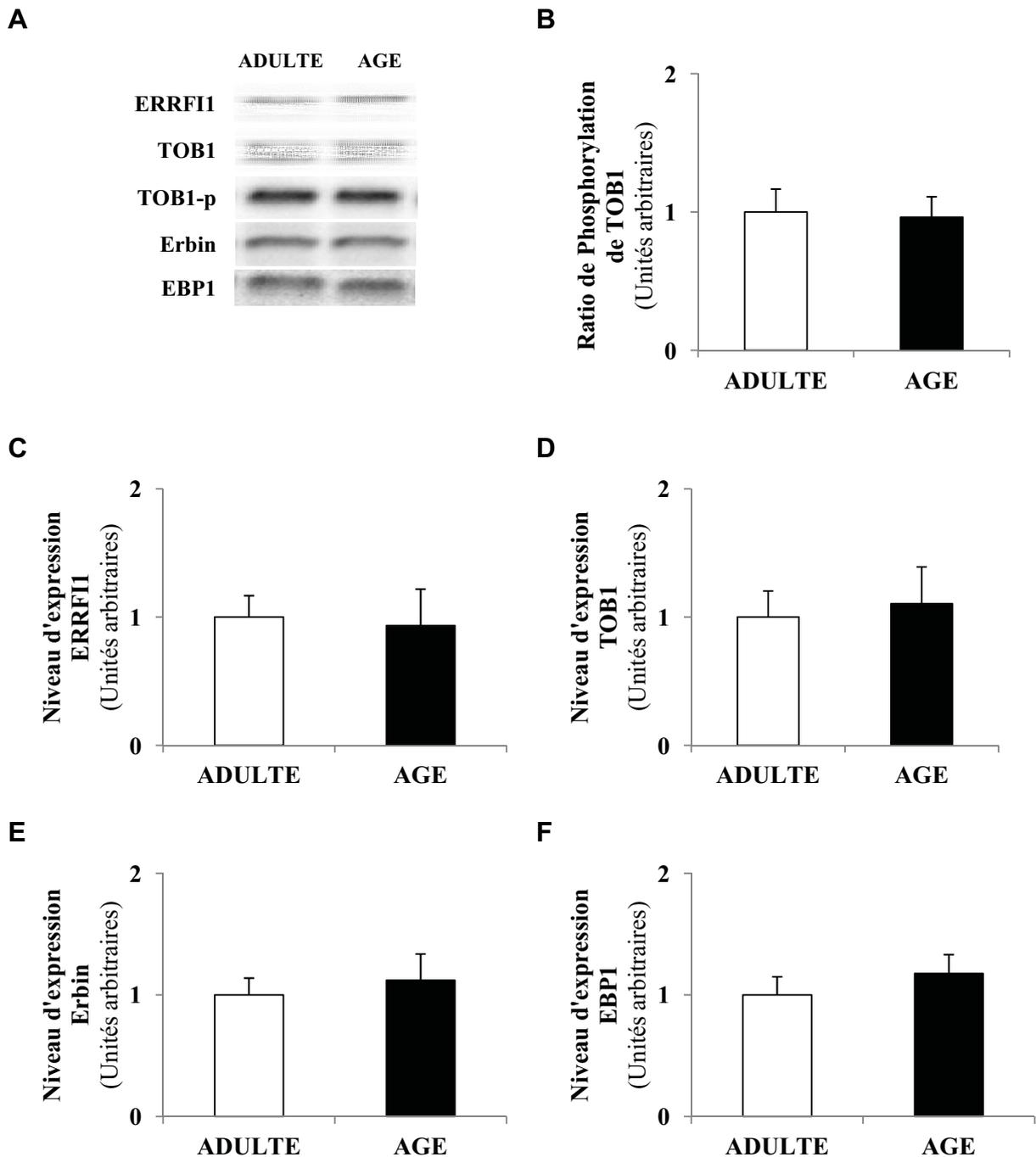
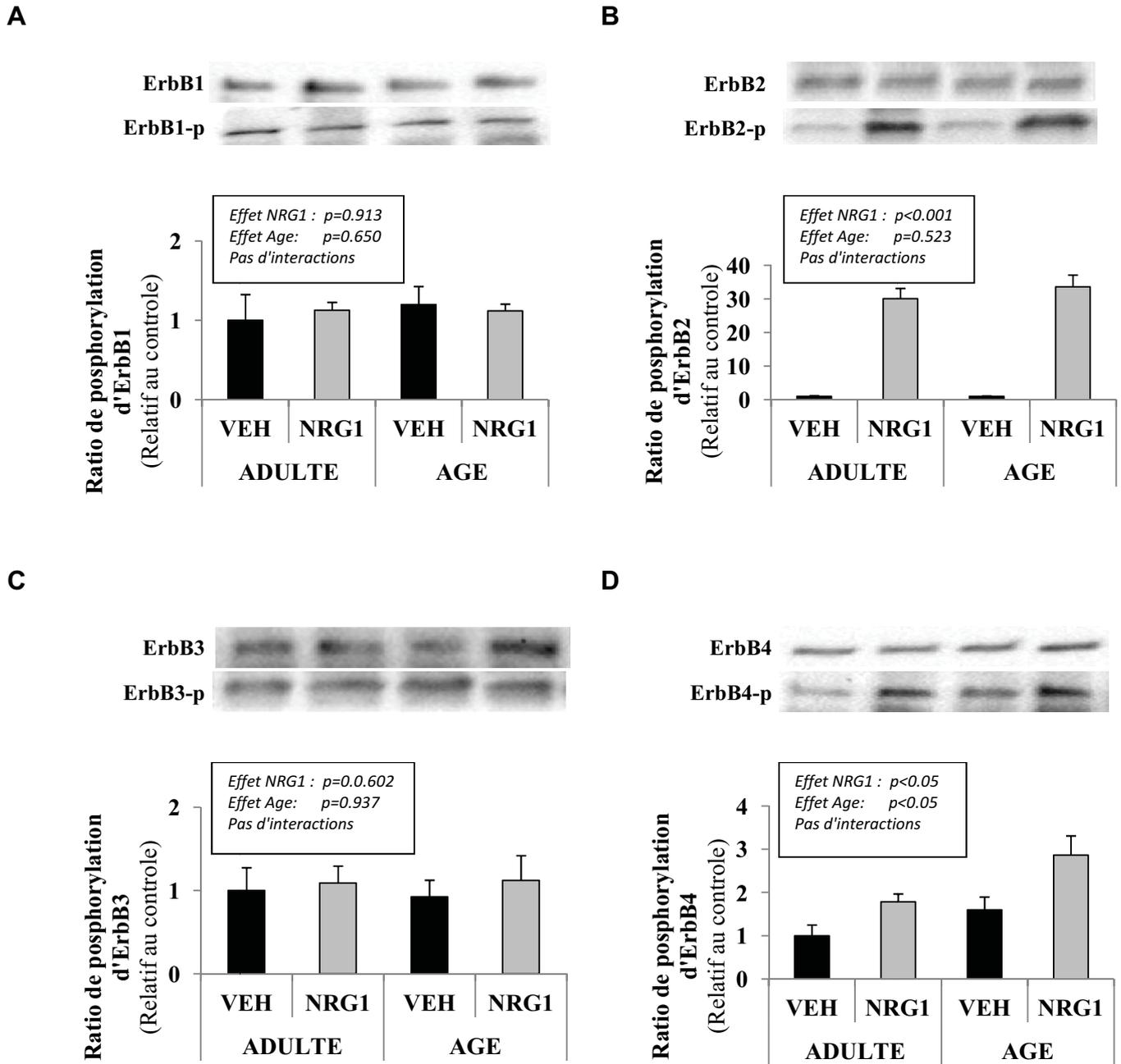


FIGURE 49: EXPRESSION BASALE DES PROTEINES DE REGULATION DES ERBBS DANS LE COEUR DE RATS ADULTES ET AGES.

Les valeurs sont représentées comme suit : moyennes  $\pm$  SEM.

### **3.3 ACTIVATION DES RECEPTEURS ERBBS PAR LA NRG1**

Après avoir réalisé une injection de NRG1 ou de VEH chez des rats adultes et âgés, nous avons analysé la réponse cellulaire au niveau cardiaque en commençant par les récepteurs ErbBs (Figure 50). Un effet NRG1 a été observé pour les ratios de phosphorylation des récepteurs ErbB2 et ErbB4 (Figure 50 ; B et D). A l'inverse, les récepteurs ErbB1 et ErbB3 ne présentent pas de modification du ratio de phosphorylation suite à l'injection de NRG1 (Figure 50 ; A et C). Aucune interaction entre effet âge et effet NRG1 n'a été détectée pour l'activation des récepteurs ErbB2 et ErbB4 (Figure 50 ; B et D). Toutefois, un effet âge a été observé sur la phosphorylation d'ErbB4 quelle que soit la condition (NRG1 vs VEH) (Figure 50 ; D).



**FIGURE 50: EFFET D'UNE INJECTION AIGUE DE NRG1 SUR LES RATIOS DE PHOSPHORYLATION DES ERBBs DANS LE COEUR DE RATS ADULTES ET AGES.**

Les valeurs sont représentées comme suit : moyennes  $\pm$  SEM.

### 3.4 ACTIVATION DES VOIES DE SIGNALISATION EN AVAL DES ERBBS

L'injection de NRG1 a augmenté le ratio de phosphorylation d'AKT et de ERK1/2 (Figure 51 ; A et B). Aucun effet âge n'a été trouvé sur le niveau de phosphorylation d'AKT, ni aucune interaction entre effet de la NRG1 et effet de l'âge. A contrario, une interaction a été trouvée en ce qui concerne la phosphorylation d'ERK1/2. Nous avons donc procédé à un test post-hoc. Nous avons trouvé que le niveau de phosphorylation d'ERK1/2 dans le groupe VEH ADULTE était significativement inférieur aux trois autres groupes. A l'état basal (VEH), le ratio de phosphorylation d'Erk1/2 était donc significativement supérieure chez les rats âgés par rapport aux rats adultes (Figure 51 ; B). Et d'autre part, l'injection de NRG1 n'a augmenté le ratio de phosphorylation que dans le groupe ADULTE (Figure 51 ; B).

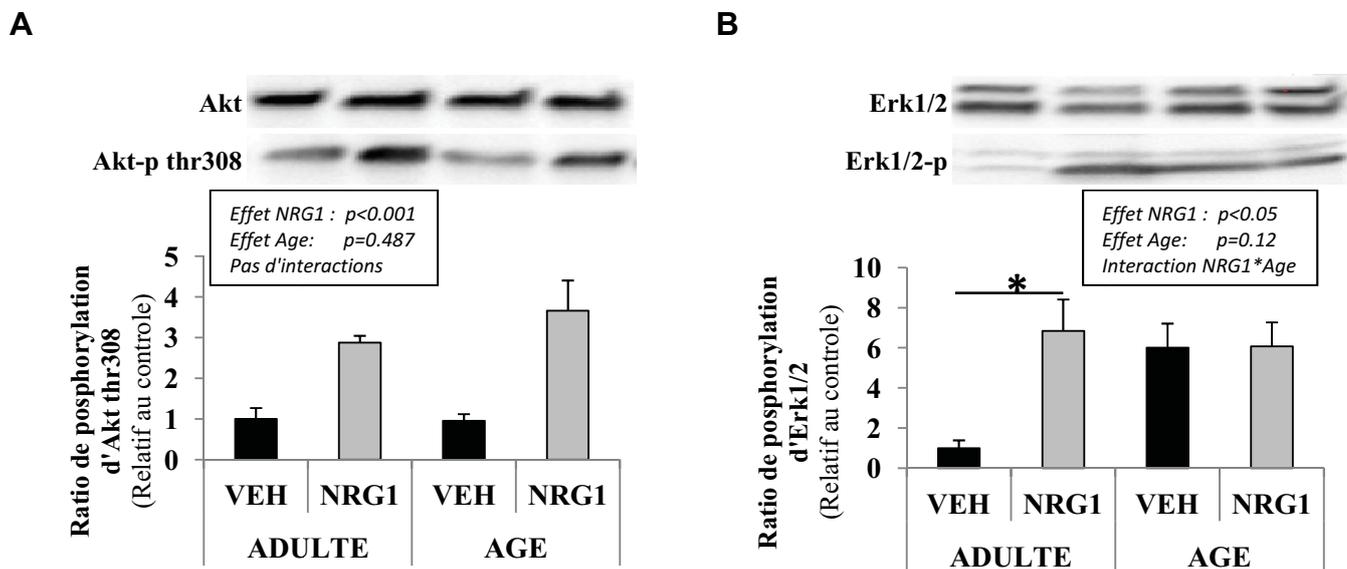


FIGURE 51: EFFET D'UNE INJECTION AIGUE DE NRG1 SUR LES RATIOS DE PHOSPHORYLATION D'AKT ET ERK1/2 DANS LE COEUR DE RATS ADULTES ET AGES.

Les valeurs sont représentées comme suit : moyennes  $\pm$  SEM.

## 4 DISCUSSION

### *Effet du vieillissement la voie NRG1/ErbB au niveau cardiaque.*

Nous nous sommes posé la question de l'impact du vieillissement sur l'expression des ErbBs dans le cœur de rat. Pour cela, nous avons réalisé une analyse de l'expression d'ErbB1, ErbB2, ErbB3 et ErbB4 dans le cœur de rats adultes et âgés (Figure 1). Nos résultats ne montrent aucune variation des quantités d'ErbBs avec l'âge (Figure 1 ; B-E). Or, dans le cadre d'une cardiomyopathie diabétique chez le rat, il a été montré une diminution de l'expression d'ErbB2 et ErbB4 (Gui et al, 2012). De même, au stade final de la dysfonction cardiaque induite par une sténose aortique, l'expression des ErbB2 et ErbB4 était diminuée (Rohrbach et al, 1999). La voie NRG1/ErbB n'est donc pas modulée chez nos rats âgés ou, inversement, la perturbation cardiaque est modérée chez ces animaux.

Nous avons ensuite procédé à une quantification de certaines protéines régulant les fonctions des ErbBs dans le cœur de rats adultes et âgés. Comme pour les taux d'ErbB, les niveaux d'expression d'ERRFI1, Erbin et EbB1 n'étaient pas affectés par l'âge (Figure 49 ; C, E et F). Il est toutefois possible que des animaux d'un âge plus avancé présenteraient des variations d'expression de ces différentes x régulatrices et notamment d'ERRFI1. En effet, ERRFI1, protéine inhibitrice d'ErbB1, s'est vue attribuer récemment un rôle dans les processus de sénescence (Milewska et Kolch, 2014 ; Xie et al, 2013).

D'autre part, une étude génomique récente a montré un rôle potentiel de TOB1, inhibiteur d'ErbB2, dans la régulation de la prolifération cardiaque post-natale (Gan et al, 2015). Pourtant, nous n'observons aucun effet de l'âge sur l'expression et le ratio de phosphorylation de TOB1 entre les deux groupes de rats (Figure 49 ; B et D). Trop peu d'éléments sont pour le moment à notre disposition pour conclure sur la signification de ces résultats. Toutefois, le récepteur ErbB2 étant une protéine d'un intérêt majeur dans la physiopathologie cardiaque (Odiete et al, 2012), il est probable que des rôles importants seront prochainement dévolus à TOB1.

L'ensemble de ces résultats sur les ErbBs et leurs protéines de régulation semblent confirmer l'absence d'altérations liées à l'âge sur la voie NRG1/ErbB au repos.

### ***Effet du vieillissement sur la signalétique cardiaque de la NRG1.***

Malgré cette absence des variations des ErbBs ou de leur protéine de régulation, il n'était pas certain que la NRG1 puisse agir avec la même efficacité chez l'animal âgé. Nous avons donc analysé par western blot la phosphorylation des ErbBs suite à une injection intraveineuse de NRG1 chez des rats âgés et adultes. Conformément à la plupart des données de la littérature, nous avons observé une activation des récepteurs ErbB2 et ErbB4 mais pas des ErbB1 et ErbB3 suite à l'injection de NRG1 (Figure 50 ; Zhao et al, 1998 ; Baliga et al, 1999). De plus, l'effet de la NRG1 n'était pas significatif dans les deux groupes (Figure 50 ; B et D). Le processus de vieillissement ne semble donc pas impacter la liaison de la NRG1 sur ces récepteurs cardiaques, de même que la phosphorylation qui en découle.

Toutefois, nous avons observé un niveau de phosphorylation du récepteur ErbB4 supérieur chez les rats âgés par rapport aux rats adultes quelles que soient les conditions (NRG1 ou VEH) (Figure 50 ; D). Cette observation a déjà été réalisée dans la littérature sur un modèle animal d'ischémie-reperfusion (Lemmens et al, 2011). Dans cette étude, ce phénomène est expliqué par une augmentation de l'expression de la NRG1 à même d'activer le récepteur ErbB4.

Or, cette équipe avait proposé un modèle chronologique de la modulation de la voie NRG1/ErbB au fur et à mesure du développement d'une insuffisance cardiaque (Figure 17 ; Lemmens et al, 2007). Celui-ci décrit une première phase compensatoire durant laquelle la voie serait stimulée sans impacte sur l'expression des ErbBs. En effet, on observe une hausse de l'expression de la NRG1 durant la phase initiale hypertrophique de l'insuffisance cardiaque (Lemmens et al, 2006). C'est également le cas lors d'une hypertrophie physiologique liée à la gestation chez l'animal (Lemmens et al, 2011). Cette hausse de la NRG1 aboutit à une stimulation chronique des ErbBs (Figure 50 ; D). Nos résultats laissent supposer une activation basale de la voie chez les rats âgés et une potentielle augmentation de l'expression de la NRG1 expliquerait ce phénomène. Des investigations complémentaires devront être réalisées pour vérifier cette hypothèse.

### ***Effet du vieillissement sur l'activation des voies de signalisation intracellulaires au niveau cardiaque.***

La NRG1 en se fixant à ErbB4, qui se dimérise ensuite avec ErbB2, active différentes voies de signalisation parmi lesquelles les MAPK, PI3K/AKT et Src/FAK (Meyer et al, 1995, Zhao et al, 1998 ; Baliga et al, 1999). La réponse du récepteur ErbB2 n'était pas différente entre nos deux groupes or l'activation de la voie Src/FAK semble principalement dépendre de ce dernier (Kuramochi et al, 2006). En conséquence, nous nous sommes uniquement intéressés aux voies des MAPK et de PI3K/Akt qui impliquent ErbB4 (Fukazawa et al, 2003 ; Baliga et al, 1999).

L'analyse du tissu cardiaque des rats adultes a révélé une activation à la fois d'Akt et d'Erk1/2 par l'injection de NRG1 (Figure 51) ce qui est en accord avec les nombreux résultats précédemment publiés (Fukazawa et al, 2003 ; Baliga et al, 1999 ; Meyer et al, 1995, Zhao et al, 1998 ; Baliga et al, 1999). Toutefois, cette activation n'était réellement significative que dans le groupe ADULTE (Figure 51, B). Cette observation laisse présager une préservation des propriétés de survie cellulaire de la NRG1, via Akt, mais pas de ses propriétés de préservation de l'intégrité du sarcomère (Sawyer et al, 2011).

De plus, il a été montré que l'activation aigue d'ERK1/2 était primordiale dans les processus de régénération post-ischémique induit par un protocole de reperfusion optimisé (Przyklenk et al, 2008). Dans cette étude, un groupe de souris âgées a été soumis au même protocole et il a été observé une absence d'activation d'ERK chez les souris âgées (20-24 mois) par rapport aux souris adultes (3-4 mois). En outre, la voie de la NRG1 est connue pour son rôle durant la régénération post événement ischémique (Hedhli et al, 2011 ; Liang et al, 2015 ; Bersell et al, 2009). Nous avançons donc l'hypothèse que la moindre activation d'ERK1/2 par la NRG1 en aigu pourrait participer à la diminution des capacités régénératives du muscle cardiaque âgé (Bergmann et al, 2009).

A l'état basal (non injecté), nous avons également observé un niveau de phosphorylation d'ERK1/2 significativement supérieur dans le groupe âgé par rapport au groupe adulte. Or, l'activation d'ERK1/2 est un facteur impliqué dans l'hypertrophie cardiaque (Bueno et Molckentin, 2002). De plus, il a déjà été montré une activation chronique d'ERK1/2 chez le rat âgé (Castello et al, 2011). Dans cette

étude, une restriction calorique intermittente (ADF) a amélioré certains marqueurs biologiques ou morphologiques de l'hypertrophie et diminué dans le même temps la phosphorylation d'ERK1/2. Par ailleurs, la restriction calorique avait déjà été évoquée pour ses propriétés thérapeutiques sur le cœur âgé et la normalisation de la voie NRG1/ErbB faisait partie des hypothèses avancées (Rohrbach et al, 2006). Cette publication ne faisait toutefois pas suite à un protocole expérimental et la conclusion des auteurs était purement spéculative.

Au regard de notre résultat sur l'activation d'ERK1/2, nous émettons l'hypothèse que l'absence d'effet de la NRG1 sur la phosphorylation d'ERK1/2 proviendrait de l'augmentation du niveau de phosphorylation de la protéine à l'état basal. Ce niveau élevé de phosphorylation serait à même d'empêcher une augmentation au delà du niveau déjà atteint.

En synthèse, à l'état basal le récepteur ErbB4 présente un niveau d'activation supérieur et l'injection de NRG1 n'augmente pas le niveau de phosphorylation d'ERK1/2 dans le cœur de rats âgés. Toutefois, le lien de causalité entre ces deux phénomènes n'a pas été démontré dans notre étude et il paraît difficile à établir dans la mesure où ERK1/2 peut être phosphorylé suite à de nombreux stimuli (Bueno et Molkentin, 2002).

### **Conclusion**

Les résultats de cette étude montrent que la fonctionnalité de la voie NRG1/ErbB est modulée par le vieillissement au niveau cardiaque. En accord avec les éléments connus sur les dysfonctions cardiaques liées à l'Age et le modèle de Lemmens et al. (2007), l'activation basale d'ErbB4 pourrait caractériser le stade précoce d'apparition d'une hypertrophie ventriculaire. Cette hypothèse est cohérente avec l'observation d'une activation, également basale, d'ERK1/2 dont le rôle inducteur de l'hypertrophie cardiaque est démontré (Bueno et Molkentin, 2002). Parallèlement à ces résultats, l'injection de NRG1 a montré sa capacité à stimuler la phosphorylation d'Akt mais pas d'ERK1/2 dans le cœur âgé. Cette observation concorde avec la moindre capacité de régénération du cœur âgé.

---

## DISCUSSION GENERALE

« Vieillir, c'est encore le seul moyen qu'on a trouvé de vivre  
longtemps. »

*Charles-Augustin de Sainte-Beuve*

L'objectif de cette thèse était d'étudier les effets du vieillissement sur la fonctionnalité de la voie NRG1/ErbBs dans deux grands systèmes : la régulation de l'homéostasie glucidique et la fonction musculaire. Ainsi, trois études ont été réalisées afin de répondre aux objectifs suivants:

#### Pour l'homéostasie du glucose (Etude 1)

- De caractériser l'effet de la NRG1 sur l'homéostasie du glucose et plus particulièrement lors d'un challenge glucidique qui révèle les premiers signes de perturbations avec l'âge.
- De définir le ou les organes impliqués dans l'effet de la NRG1.
- De définir les voies de signalisation impliquées.

#### Pour la fonction musculaire (Etude 2 et 3)

- De déterminer l'effet de la contraction du muscle squelettique IN VIVO sur la voie de signalisation de la NRG1.
- De définir l'effet du vieillissement sur l'activation de la voie NRG1/ErbB par la contraction musculaire.
- De déterminer l'effet du vieillissement sur la réponse du muscle cardiaque à la NRG1.

D'une part, nous avons émis l'hypothèse que la NRG1 pourrait avoir un effet hypoglycémiant, probablement via la captation du glucose musculaire, et que le vieillissement impacterait négativement cet effet.

D'autre part, nous avons supposé que le vieillissement pourrait moduler la voie de la NRG1 au niveau du muscle, squelettique et/ou cardiaque, et notamment limiter la libération par clivage de la NRG1 au niveau musculaire lors d'une contraction musculaire.

Notre première étude s'est intéressée à l'effet de l'injection systémique de NRG1 sur la régulation de l'homéostasie glycémique durant un OGTT. Nous n'étions pas les premiers à réaliser un tel préconditionnement avec de la NRG1 avant d'induire une perturbation homéostatique. Ce type de procédure avait déjà été effectué préalablement à l'injection de Doxorubicine (Bian et al, 2009), à la réalisation d'une lésion carotidienne (Clement et al, 2007) et l'induction d'une ischémie cérébrale (Xu et al, 2004). Dans ces différentes conditions, la NRG1 avait accéléré la régénération et/ou protégé les cellules du trauma. Toutefois, nous avons été les premiers à étudier le rôle de la NRG1 durant une perturbation de la glycémie.

Or, nous avons observé que l'injection aigue de NRG1 améliore la tolérance au glucose durant un challenge glucidique chez des rats adultes (6 mois) et âgés (22 mois). Contrairement à notre hypothèse de départ, cet effet hypoglycémiant de la NRG1 a ciblé le foie mais pas le muscle squelettique. En effet, nous n'avons détecté aucune modification des signaux cellulaires dans le muscle squelettique, tandis que la voie NRG1/ErbB était activée dans le foie. Enfin, nous n'avons observé aucun effet de l'âge sur les effets systémiques et cellulaires de la NRG1. Ces résultats confèrent à la NRG1 un rôle thérapeutique potentiel très intéressant dans un contexte de résistance à l'insuline chez l'adulte ou un sujet présentant les premières perturbations attribuables au vieillissement. En parallèle du travail présenté dans ce manuscrit, nous avons également observé une amélioration de la tolérance au glucose lors d'un OGTT sur un modèle de souris db/db. De surcroit, nous avons pu explorer plus en profondeur le mécanisme impliqué et il s'avère en tout point similaire à celui de l'insuline puisque la NRG1 active FOXO. L'effet hypoglycémiant de la NRG1 serait donc probablement lié à une baisse de la production hépatique de glucose par la néoglucogenèse (Ennequin et al, 2015).

Notre deuxième étude s'est intéressée à l'effet de la contraction musculaire sur la voie NRG1/ErbB dans un contexte de vieillissement. Nos résultats ont remis en question notre postulat de départ de l'effet de la contraction sur le clivage de la NRG1. En effet, nous avons montré que la contraction musculaire *in vivo* chez le rat n'induit pas de clivage de la NRG1. Nous avons conclu que la divergence, entre nos résultats et les études antérieures, pourrait être due à des différences d'ordre méthodologique (Canto et al, 2006), mais notre hypothèse s'avère plus en faveur d'une mauvaise interprétation de ses résultats par l'équipe à l'origine de cette

publication (Lebrasseur et al, 2003). Après échange sur le sujet avec l'équipe en question, nous semblons en accord sur le sujet. Toutefois, nous avons été les premiers à observer un clivage d'ErbB4 dans le muscle squelettique et ce, suite au protocole d'électrostimulation. Le signal biochimique détecté correspondait, par son poids moléculaire, au produit d'un mécanisme de solubilisation du domaine intracellulaire d'ErbB4 d'ores et déjà décrit dans la littérature (Sanderson et al, 2006). De plus, nous avons montré que le vieillissement abroge, semble-t-il, totalement la libération de ce fragment. Nous nous sommes intéressés aux mécanismes potentiellement à l'origine de cette différence liée à l'âge et nos résultats suggèrent un déficit de l'activité musculaire d'ADAM17, une métalloprotéase responsable du clivage extracellulaire de ce récepteur. Toutefois, aucune étude n'a été réalisée jusqu'alors sur ce mécanisme au niveau du muscle squelettique. Des effets du fragment intracellulaire d'ErbB4 ont été montrés sur la prolifération cellulaire mais à ce stade, le rôle joué par ce dernier au niveau musculaire reste purement spéculatif.

Notre troisième étude s'est focalisée sur la fonctionnalité de la voie NRG1 au niveau cardiaque, et nos résultats montrent le vieillissement altère celle-ci. A l'état basal, nous observons une phosphorylation accrue d'ErbB4 chez le rat âgé. De plus, nous avons fait le même constat pour ERK1/2 dont le ratio de phosphorylation est augmenté avec l'âge. Or, durant la gestation, l'activation chronique de la voie NRG1/ErbB et notamment d'ErbB4 permet une hypertrophie physiologique. ERK1/2 participe également au processus pathologique de l'hypertrophie cardiaque (Bueno et Molkenin, 2002). Au regard de ces éléments, nous émettons l'hypothèse que nos rats âgés pourraient être au stade précoce d'une hypertrophie ventriculaire gauche.

Parallèlement à ces résultats, nous avons observé une incapacité de la NRG1 à activer ERK1/2 dans le cœur des rats âgés. Or, la voie des MAPK a été proposée comme médiatrice des effets positifs de la NRG1 sur les défenses anti-oxydantes (Giraud et al, 2005). Le stress oxydant étant particulièrement impliqué dans le vieillissement cardiaque (Phaneuf et Leeuwenburgh, 2002), la baisse d'efficacité de la NRG1 pourrait participer à la hausse de l'apoptose des cardiomyocytes (Foo et al, 2005). Enfin, reste une interrogation sur le lien de causalité possible entre les observations réalisées sur ErbB4 et ERK1/2 à l'état basal. L'exploration de ce lien potentiel devra être complétée par des investigations visant à déterminer l'origine du découplage entre activation d'ErbB4 et d'ERK1/2.

En synthèse, la NRG1 possède un potentiel de régulation de l'homéostasie glucidique préservé avec l'âge. A l'inverse, sa fonctionnalité cardiaque semble amoindrie par le vieillissement ce qui pourrait diminuer son intérêt pour une utilisation chronique chez le patient insuffisant cardiaque âgé. Enfin, la contraction du muscle squelettique, à l'échelle du muscle entier, n'impacte pas le clivage de la NRG1 mais à promu le clivage intracellulaire d'ErbB4. Cette dernière observation constitue à elle seule un champ d'investigation potentielle extrêmement riche. Les translocations au niveau nucléaire, ou même mitochondrial, qui ont été observées ouvrent des perspectives dans de très nombreuses fonctions impliquées dans le vieillissement musculaire.

Loin d'être canoniques, les résultats obtenus durant ces travaux se sont révélés en désaccord avec la littérature, d'une grande variabilité entre les différents tissus et d'une complexité méthodologique parfois déroutante. Toutefois, la voie NRG1/ErbB étant une des voies cellulaires les plus étudiés de la transduction du signal, il n'est pas surprenant que nous ayons rencontré surprises et difficultés durant ce travail.

Nous avons beaucoup appris sur cette voie de signalisation et certains éléments nous paraissent particulièrement intéressants à développer pour l'apport substantiel de compréhension qu'ils représentent.

## **Le modèle *in vitro* ou *in vivo* est un déterminant majeur des résultats obtenus.**

Tout d'abord, au niveau musculaire nos résultats sont en contradiction avec de nombreuses études parues depuis le début des années 2000 (Suarez et al, 2001 ; Canto et al, 2004-2006-2007 ; Lebrasseur et al, 2003 ; Hellyer et al, 2006). Toutefois, nous attribuons ces différences à des variations méthodologiques et notamment aux modèles biologiques utilisés. Les résultats obtenus sur la captation du glucose l'ont été essentiellement sur modèle *in vitro*, or les différences de phénotype d'expression de la voie NRG1/ErbB entre culture cellulaire et modèle *in vivo* sont notables. Nous avons procédé à des analyses au laboratoire visant à comprendre les divergences de résultats et nous nous sommes aperçus que l'expression des récepteurs ErbBs était largement supérieure dans les cellules C2C12 par rapport à nos échantillons de rats adultes.

De plus, en analysant les résultats de nos prédécesseurs nous avons trouvé des éléments corroborant nos hypothèses. Par exemple, Canto et al. (2004) ont procédé à des incubations en NRG1 sur des cellules L6E9 de rats et des muscles *ex vivo*. Or, ils observent une activation d'AKT et de PKC dans les cellules L6E9 mais pas d'AKT sur les strips de muscles (soleus) *ex vivo*. Les résultats obtenus par Hellyer et al. (2006) sont complémentaires de ceux-ci. En effet, cette équipe a également incubé des cellules C2C12 de souris et des strips de diaphragme de rats avec de la NRG1 et les résultats montrent une activation de la protéosynthèse dans les deux modèles. Cependant, les rats sur lesquels les diaphragmes de rats ont été excisés n'avaient que trois jours ce qui implique que leur développement n'était pas terminé. Les patterns d'expression durant la phase post natale des différentes protéines de la voie NRG1/ErbB sont mal connus. Toutefois, à titre d'exemple, le récepteur ErbB2 joue un rôle majeur durant la phase foetale dans le foie puis disparaît à partir de la deuxième semaine de développement postnatal (Carver et al, 2002). Au niveau du muscle squelettique, ces éléments sont à mettre en perspective avec le rôle primordial de la NRG1 dans la myogenèse. Par ailleurs, et pour conclure cette démonstration, Ford et al. (2003) ont montré que le niveau de différenciation des cellules musculaires influe considérablement sur le potentiel myogénique de la NRG1. En effet, sur des myotubes multinucléés la NRG1 n'a pas induit de synthèse d'ADN tandis que sur des myoblastes L6 de rats elle l'a multipliée par 2 à 5.

L'âge et surtout le stade de différenciation du modèle semblent donc des variables essentielles à prendre en compte pour l'investigation des rôles de cette voie. Nous proposons donc un modèle évolutif de la fonctionnalité de la NRG1 dans le muscle squelettique. Les modèles de cellules en culture présentent, selon nous, un phénotype fœtal ou néonatal de la voie NRG1/ErbB et la NRG1 y induit donc de très nombreux effets physiologiques. Ensuite, chez l'animal très jeune, comme le modèle utilisé par Hellyer et al. (2006), la NRG1 semble encore faire effet sur l'ensemble du muscle squelettique. Toutefois chez des rats âgés d'un à deux mois, comme le modèle utilisé par Canto et al. (2004), certaines signalétiques cellulaires sont déjà absentes. Enfin chez des rats de 6 mois ou 22 mois comme c'était le cas dans notre étude, nous émettons l'hypothèse que le muscle squelettique n'est majoritairement plus sensible à la NRG1. En 2015, comme pour valider ce modèle, une étude portant sur l'utilisation de la NRG1 dans le cadre des insuffisances cardiaques pédiatriques a conclu en faveur d'une probable fenêtre thérapeutique d'administration dépendante de l'âge des patients (Polizzotti et al, 2015). Il semble que la NRG1 soit particulièrement plus efficace pour induire la régénération cardiaque chez des enfants de moins de 6 mois. Ceci vient à nouveau renforcer le rationnel selon lequel le modèle et l'âge sont des déterminants majeurs de l'effet de la NRG1.

### **L'activité régénératrice serait-elle un facteur probable de modulation des effets de la NRG1 dans un tissu ?**

Notre modèle est probablement prédictif des effets de la NRG1 dans une population mais il ne prend pas en compte certains stress physiologiques comme les épisodes régénératifs. En effet, la NRG1 est fortement impliquée dans les phénomènes de régénération musculaire (Hirata et al, 2007) et cardiaque (Yutzey 2015). Ce rôle régénératif conforte notre hypothèse précédente puisque les mécanismes physiologiques du développement et de la régénération sont souvent communs (Grefte et al, 2007). Or, le foie est le seul organe chez l'homme à pouvoir être régénérer pratiquement totalement après une chirurgie et le récepteur ErbB1 est particulièrement impliqué dans ce phénomène (Michalopoulos 2013). Compte tenu de cela, le phénotype particulier du foie pourrait en partie expliquer la réponse importante à la NRG1 dans cet organe et la persistance de son effet avec l'âge. Selon cette approche, l'activité de régénération basale dans un tissu pourrait donc prédire l'amplitude des effets de la NRG1. En soutien de cette hypothèse, un

traitement avec de la NRG1 durant 3 mois chez la souris mdx (modèle de myopathie de Duchenne) a amélioré les propriétés biomécaniques musculaires et diminué les signes histologiques de dégradation (Krag et al, 2004). Les dystrophinopathies étant caractérisé par des cycles permanents de dégradation/régénération, la NRG1 pourrait alors agir efficacement dans ce contexte. De même, nous avons obtenus des résultats préliminaires sur du tissu musculaire squelettique à différents temps durant la phase de récupération après le plâtrage d'une patte chez le rat. Nous avons alors observé une hausse de l'expression de la NRG1 avec un pic à 21 jours puis une normalisation du niveau d'expression à 40jours de récupération. Ces résultats étaient concordants avec la cinétique de récupération de la masse musculaire. Cette hausse rappelle les phénomènes pathologiques rapportés sur certain modèles expérimentaux d'insuffisance cardiaque.

### **L'importance des microdomaines cellulaires à prendre en compte ?**

La question du rôle de la NRG1 amène une troisième analyse de nos résultats. Nous avons réalisé des prélèvements de muscles entiers pour analyser la réponse à la NRG1. Cette méthode a l'avantage de donner un aperçu du rôle dans l'ensemble de l'organe qu'est le muscle cardiaque ou squelettique. Toutefois, elle fait l'impasse sur les phénomènes locaux comme l'activation des cellules satellites qui présentent par définition un phénotype moins différencié. Il est donc possible que des phénomènes d'activation dans des zones réduites se soient révélés invisibles avec nos moyens d'investigations. Analysées séparément, les cellules satellites ont montré une augmentation de l'expression de NRG1 durant la régénération (Hirata et al, 2007). De plus, la NRG1 était retrouvée, dans cette même étude, au niveau axonal sans augmentation de ses ARNm. Ceci suggère fortement une capacité des cellules satellites à promouvoir non seulement la régénération du tissu musculaire mais aussi des tissus nerveux. Ce mécanisme optimiserait la régénération de la jonction neuromusculaire où est concentrée la NRG1 (Jo et al, 1995). Or, l'innervation est un élément majeur de la régulation de l'expression de la NRG1 au niveau musculaire (Nicolino et al, 2009). Certains auteurs suggèrent ainsi que la NRG1 pourrait médier les effets de l'exercice physique sur l'intégrité de la jonction neuromusculaire (Nishimune et al, 2014). Or, nous avons obtenu des effets de l'exercice chronique sur le clivage de la NRG1 (Ennequin et al, 2015), dont le rôle reste encore à déterminer.

Le travail présenté dans ce manuscrit présente un certain nombre de limites.

Tout d'abord, nous avons utilisé un seul isoforme de NRG1 pour les injections, aussi nous ne pouvons exclure des effets différents en cas d'utilisation d'un autre isoforme. Aucune donnée de la littérature n'existe à l'heure actuelle sur ces éléments, mise à part pour la différence en forme alpha et beta du domaine EGF.

L'influence de la NRG1 sur la glycémie n'a été étudiée que lors d'un OGTT. L'exploration de conditions métaboliques différentes telles que la condition à jeun pourrait révéler des éléments complémentaires.

Également, suite à l'injection, nous n'avons exploré qu'un seul temps. Il est possible que certains signaux cellulaires plus précoces ou plus tardifs n'aient pas été détectés avec une analyse à 30 min.

L'exploration des mécanismes cellulaires reste encore très incomplète et de nombreux régulateurs cytoplasmiques, ou facteurs de transcription, sont encore à approfondir.

L'un des éléments manquant dans nos études est l'exploration de conséquences fonctionnelles, particulièrement au niveau cardiaque et musculaire.

Enfin, notre modèle de rats âgés est un modèle de vieillissement précoce, il n'est pas impossible qu'un âge plus avancé aurait impacté différemment la voie de la NRG1/ErbBs ou les effets physiologiques d'une injection de NRG1.

---

## PERSPECTIVES

Les futures investigations potentiellement basées sur nos travaux peuvent s'orienter dans deux voies : une intervention en activité physique ou une utilisation pharmacologique de la NRG1.

Tout d'abord, nos résultats montre chez le rat âgé une baisse d'ADAM17 concomitante d'une hausse de TIMP3, or c'est exactement l'inverse des résultats obtenus par notre équipe avec un entraînement chronique chez le rat obèse (Ennequin et al, 2015). Ainsi, il paraît très intéressant de réaliser un entraînement chronique chez le rat âgé afin de déterminer si l'exercice chronique est à même de normaliser les taux de ces protéines. Consécutivement, un protocole d'électrostimulation pourrait être réalisé pour observer si le clivage d'ErbB4 en aigu est normalisé par l'exercice chronique chez ces mêmes rats âgés.

De même, nous avons obtenu des résultats préliminaires montrant une hausse des taux plasmatiques de NRG1 grâce à un entraînement chez des patients en surpoids. De plus, une corrélation négative entre les taux circulants de NRG1 et l'âge a été observée. De ce point de vue, soumettre des patients âgés à un exercice chronique pourrait permettre d'augmenter les taux plasmatiques de NRG1 avec de possibles effets positifs dans les tissus répondeurs comme le cœur, le foie ou le muscle.

La question de la détection de la NRG1 au niveau plasmatique chez l'animal est un pas déterminant pour permettre une approche plus mécanistique de ces protocoles. Nous pourrions alors mettre en place des modèles animaux de KO conditionnels dans certains tissus afin de déterminer si une libération de NRG1 a lieu durant l'exercice et si oui quels organes sont impliqués.

Les résultats de notre équipe tendent à montrer une réponse chronologique différentielle à l'exercice physique des protéines de la voie NRG1/ErbB. Tandis qu'un entraînement augmente le clivage au repos de la NRG1 (Ennequin et al, 2015), l'exercice aigu pourrait agir sur l'activité transcriptionnelle directement via la solubilisation cytosolique de l'ICD d'ErbB4. Dans la perspective de poursuivre l'étude de ce mécanisme, nous pourrions faire réaliser des sessions d'exercice à des rats

KO conditionnels pour la forme JMa (clivable) d'ErbB4 au niveau musculaire. En réalisant une analyse du profil transcriptionnel post-exercice chez ces animaux, nous serions en mesure de progresser sur la compréhension des rôles joués par ce fragment. Une autre approche similaire serait d'induire une surexpression de la forme clivable qui est minoritaire dans le muscle squelettique

Enfin, même si dans notre étude le muscle ne semble pas libérer la NRG1 lors de la contraction, d'autres travaux se focalisant plus précisément sur l'interface nerf muscle ont montré un rôle important de la NRG1. L'investigation du rôle de la NRG1 dans ce tissu pourrait donc nécessiter une approche locorégionale centrée sur la jonction neuromusculaire et l'activation des cellules satellites. Diverses modalités d'exercice pourraient être testées comme par exemple l'exercice excentrique. Ce type de contraction est en effet le plus à même d'induire un processus régénératif comme en témoigne la déstabilisation de la jonction neuromusculaire ou l'activation des cellules satellites consécutives à ce type d'exercice. Dans une approche locale plus mécanistique, une injection intramusculaire aigue ou un traitement chronique avec de la NRG1 serait intéressant à réaliser immédiatement après un exercice lésionnel de type excentrique afin d'observer une éventuelle accélération du processus régénératif. L'utilisation d'un inhibiteur des récepteurs ErbBs, ou d'animaux KO conditionnels, dans ce même contexte serait complémentaire

Dans une approche plus pharmacologique, nous pourrions nous intéresser de manière plus approfondie au potentiel thérapeutique de la NRG1 dans un contexte d'intolérance au glucose. En effet, outre les résultats présentés dans ce manuscrit, notre équipe a montré qu'un traitement avec de la NRG1 améliorait la tolérance au glucose durant un OGTT également chez des souris db/db (Ennequin et al, 2015). Le point commun entre nos deux modèles est le développement plus ou moins important d'une insulino-résistance ce qui n'altère en rien l'effet hypoglycémiant de la NRG1. Afin de mieux appréhender les interrelations entre ces deux molécules, l'évaluation de l'effet, systémique et cellulaire, de l'insuline après une injection de NRG1 pourrait nous donner un premier élément de réponse. En outre, nous nous sommes jusqu'alors focalisés sur le foie et le muscle mais la question du tissu adipeux reste entière. Compte tenu de l'importance de ce dernier dans les phénomènes d'insulino-résistance hépatique, des investigations systémiques avec mesure de taux d'acides gras plasmatiques suite à une injection de NRG1 pourraient

être intéressantes. Des prélèvements tissulaires viendraient compléter ce type de protocole pour une approche plus complète.

De plus, d'autres expérimentations en aigue sont nécessaires pour déterminer précisément les rôles respectifs des nombreuses isoformes de NRG1 dans la régulation de l'homéostasie du glucose. Nous pourrions notamment tester des injections à jeun, durant un OGTT ou lors de l'absorption de pyruvate pour déterminer les voies métaboliques ciblées par les isoformes de NRG1. Enfin, pour terminer sur ces perspectives dans le champ de l'intolérance au glucose, nous devons évoquer le rôle primordial du pancréas dans le développement du diabète de type 2. Or, une forte tendance à la diminution de l'insuline a été observée dans le groupe traité avec de la NRG1. Ainsi, l'analyse de la réponse cellulaire pancréatique, suite à l'injection de NRG1, permettrait de répondre aux questions soulevées par cette potentielle baisse de l'insuline ( $p=0.054$ ).

L'ensemble des résultats de notre équipe, qu'il concerne mon travail doctoral ou celui de Gael ENNEQUIN, semble promettre un rôle thérapeutique majeur pour la NRG1 sur l'intolérance au glucose. La cible de cet effet étant le foie, d'autres pathologies connexes comme la stéatose hépatique non-alcoolique (NASH) seront également intéressantes à étudier dans le futur.

---

# BIBLIOGRAPHIE

- Abdul-Ghani, M. A., M. Matsuda, et al. (2007). "Muscle and liver insulin resistance indexes derived from the oral glucose tolerance test." Diabetes Care**30**(1): 89-94.
- Aguilar, Z., R. W. Akita, et al. (1999). "Biologic effects of heregulin/neu differentiation factor on normal and malignant human breast and ovarian epithelial cells." Oncogene**18**(44): 6050-6062.
- Akhtar, S., M. H. Yousif, et al. (2012). "Angiotensin-(1-7) inhibits epidermal growth factor receptor transactivation via a Mas receptor-dependent pathway." Br J Pharmacol**165**(5): 1390-1400.
- Alexandre Tda, S., Y. A. Duarte, et al. (2014). "Prevalence and associated factors of sarcopenia among elderly in Brazil: findings from the SABE study." J Nutr Health Aging**18**(3): 284-290.
- Alsharidah, M., N. R. Lazarus, et al. (2013). "Primary human muscle precursor cells obtained from young and old donors produce similar proliferative, differentiation and senescent profiles in culture." Aging Cell**12**(3): 333-344.
- Altiok, N., J. L. Bessereau, et al. (1995). "ErbB3 and ErbB2/neu mediate the effect of heregulin on acetylcholine receptor gene expression in muscle: differential expression at the endplate." EMBO J**14**(17): 4258-4266.
- Andrechek, E. R., W. R. Hardy, et al. (2002). "ErbB2 is required for muscle spindle and myoblast cell survival." Mol Cell Biol**22**(13): 4714-4722.
- Andreollo, N. A., E. F. Santos, et al. (2012). "Rat's age versus human's age: what is the relationship?" Arq Bras Cir Dig**25**(1): 49-51.
- Anido, J., M. Scaltriti, et al. (2006). "Biosynthesis of tumorigenic HER2 C-terminal fragments by alternative initiation of translation." EMBO J**25**(13): 3234-3244.
- Aoyagi, T. and T. Matsui (2011). "Phosphoinositide-3 kinase signaling in cardiac hypertrophy and heart failure." Curr Pharm Des**17**(18): 1818-1824.
- Aqeilan, R. I., V. Donati, et al. (2005). "WW domain-containing proteins, WWOX and YAP, compete for interaction with ErbB-4 and modulate its transcriptional function." Cancer Res**65**(15): 6764-6772.
- Arasada, R. R. and G. Carpenter (2005). "Secretase-dependent tyrosine phosphorylation of Mdm2 by the ErbB-4 intracellular domain fragment." J Biol Chem**280**(35): 30783-30787.
- Atherton, P. J., K. Smith, et al. (2010). "Distinct anabolic signalling responses to amino acids in C2C12 skeletal muscle cells." Amino Acids**38**(5): 1533-1539.
- Atlas, E., M. Cardillo, et al. (2003). "Heregulin is sufficient for the promotion of tumorigenicity and metastasis of breast cancer cells in vivo." Mol Cancer Res**1**(3): 165-175.
- Baar, K., A. R. Wende, et al. (2002). "Adaptations of skeletal muscle to exercise: rapid increase in the transcriptional coactivator PGC-1." FASEB J**16**(14): 1879-1886.
- Balage, M., J. Averous, et al. (2010). "Presence of low-grade inflammation impaired postprandial stimulation of muscle protein synthesis in old rats." J Nutr Biochem**21**(4): 325-331.
- Balagopal, P., O. E. Rooyackers, et al. (1997). "Effects of aging on in vivo synthesis of skeletal muscle myosin heavy-chain and sarcoplasmic protein in humans." Am J Physiol**273**(4 Pt 1): E790-800.
- Baliga, R. R., D. R. Pimental, et al. (1999). "NRG-1-induced cardiomyocyte hypertrophy. Role of PI-3-kinase, p70(S6K), and MEK-MAPK-RSK." Am J Physiol**277**(5 Pt 2): H2026-2037.

- Ballinger, M. D., J. T. Jones, et al. (1998). "Selection of heregulin variants having higher affinity for the ErbB3 receptor by monovalent phage display." *J Biol Chem***273**(19): 11675-11684.
- Bandyopadhyay, G., M. L. Standaert, et al. (1999). "Dependence of insulin-stimulated glucose transporter 4 translocation on 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 and its target threonine-410 in the activation loop of protein kinase C-zeta." *Mol Endocrinol***13**(10): 1766-1772.
- Bar-Shai, M., E. Carmeli, et al. (2005). "The effect of hindlimb immobilization on acid phosphatase, metalloproteinases and nuclear factor-kappaB in muscles of young and old rats." *Mech Ageing Dev***126**(2): 289-297.
- Barberi, L., B. M. Scicchitano, et al. (2013). "Age-dependent alteration in muscle regeneration: the critical role of tissue niche." *Biogerontology***14**(3): 273-292.
- Barzilai, N., S. Banerjee, et al. (1998). "Caloric restriction reverses hepatic insulin resistance in aging rats by decreasing visceral fat." *J Clin Invest***101**(7): 1353-1361.
- Batsis, J. A., T. A. Mackenzie, et al. (2014). "Sarcopenia, sarcopenic obesity and mortality in older adults: results from the National Health and Nutrition Examination Survey III." *Eur J Clin Nutr***68**(9): 1001-1007.
- Batsis, J. A., K. R. Sahakyan, et al. (2013). "Normal weight obesity and mortality in United States subjects  $\geq 60$  years of age (from the Third National Health and Nutrition Examination Survey)." *Am J Cardiol***112**(10): 1592-1598.
- Batzer, A. G., D. Rotin, et al. (1994). "Hierarchy of binding sites for Grb2 and Shc on the epidermal growth factor receptor." *Mol Cell Biol***14**(8): 5192-5201.
- Bergamini, E., M. Bombara, et al. (1991). "Effects of different regimens of dietary restriction on the age-related decline in insulin secretory response of isolated rat pancreatic islets." *Ann N Y Acad Sci***621**: 327-336.
- Berghoff, A. S., M. Magerle, et al. (2013). "Frequent overexpression of ErbB--receptor family members in brain metastases of non-small cell lung cancer patients." *APMIS***121**(12): 1144-1152.
- Bergmann, O., R. D. Bhardwaj, et al. (2009). "Evidence for cardiomyocyte renewal in humans." *Science***324**(5923): 98-102.
- Bernecker, O. Y., F. Huq, et al. (2003). "Apoptosis in heart failure and the senescent heart." *Cardiovasc Toxicol***3**(3): 183-190.
- Bers, D. M. (2006). "Cardiac ryanodine receptor phosphorylation: target sites and functional consequences." *Biochem J***396**(1): e1-3.
- Bersell, K., S. Arab, et al. (2009). "Neuregulin1/ErbB4 signaling induces cardiomyocyte proliferation and repair of heart injury." *Cell***138**(2): 257-270.
- Bertrand, C., E. Blanchet, et al. (2013). "Mice lacking the p43 mitochondrial T3 receptor become glucose intolerant and insulin resistant during aging." *PLoS One***8**(9): e75111.
- Bian, Y., M. Sun, et al. (2009). "Neuregulin-1 attenuated doxorubicin-induced decrease in cardiac troponins." *Am J Physiol Heart Circ Physiol***297**(6): H1974-1983.
- Bijlsma, A. Y., C. G. Meskers, et al. (2013). "Diagnostic criteria for sarcopenia relate differently to insulin resistance." *Age (Dordr)***35**(6): 2367-2375.
- Biscardi, J. S., M. C. Maa, et al. (1999). "c-Src-mediated phosphorylation of the epidermal growth factor receptor on Tyr845 and Tyr1101 is associated with modulation of receptor function." *J Biol Chem***274**(12): 8335-8343.
- Bollheimer, L. C., R. Buettner, et al. (2012). "Sarcopenia in the aging high-fat fed rat: a pilot study for modeling sarcopenic obesity in rodents." *Biogerontology***13**(6): 609-620.

- Bollig-Fischer, A., T. G. Dewey, et al. (2011). "Oncogene activation induces metabolic transformation resulting in insulin-independence in human breast cancer cells." PLoS One**6**(3): e17959.
- Boucher, A. A., J. C. Arnold, et al. (2007). "Heterozygous neuregulin 1 mice are more sensitive to the behavioural effects of Delta9-tetrahydrocannabinol." Psychopharmacology (Berl)**192**(3): 325-336.
- Bouyain, S., P. A. Longo, et al. (2005). "The extracellular region of ErbB4 adopts a tethered conformation in the absence of ligand." Proc Natl Acad Sci U S A**102**(42): 15024-15029.
- Brack, A. S., M. J. Conboy, et al. (2007). "Increased Wnt signaling during aging alters muscle stem cell fate and increases fibrosis." Science**317**(5839): 807-810.
- Brero, A., R. Ramella, et al. (2010). "Neuregulin-1beta1 rapidly modulates nitric oxide synthesis and calcium handling in rat cardiomyocytes." Cardiovasc Res**88**(3): 443-452.
- Breuleux, M. (2007). "Role of heregulin in human cancer." Cell Mol Life Sci**64**(18): 2358-2377.
- Britsch, S., L. Li, et al. (1998). "The ErbB2 and ErbB3 receptors and their ligand, neuregulin-1, are essential for development of the sympathetic nervous system." Genes Dev**12**(12): 1825-1836.
- Bryg, R. J., G. A. Williams, et al. (1987). "Effect of aging on left ventricular diastolic filling in normal subjects." Am J Cardiol**59**(9): 971-974.
- Bueno, O. F. and J. D. Molkentin (2002). "Involvement of extracellular signal-regulated kinases 1/2 in cardiac hypertrophy and cell death." Circ Res**91**(9): 776-781.
- Bunprajun, T., T. I. Henriksen, et al. (2013). "Lifelong Physical Activity Prevents Aging-Associated Insulin Resistance in Human Skeletal Muscle Myotubes via Increased Glucose Transporter Expression." PLoS One**8**(6): e66628.
- Buonanno, A. and G. D. Fischbach (2001). "Neuregulin and ErbB receptor signaling pathways in the nervous system." Curr Opin Neurobiol**11**(3): 287-296.
- Cai, J., F. F. Yi, et al. (2009). "Targeted expression of receptor-associated late transducer inhibits maladaptive hypertrophy via blocking epidermal growth factor receptor signaling." Hypertension**53**(3): 539-548.
- Calvani, R., A. M. Joseph, et al. (2013). "Mitochondrial pathways in sarcopenia of aging and disuse muscle atrophy." Biol Chem**394**(3): 393-414.
- Camprecios, G., J. Lorita, et al. (2011). "Expression, localization, and regulation of the neuregulin receptor ErbB3 in mouse heart." J Cell Physiol**226**(2): 450-455.
- Cannella, B., C. J. Hoban, et al. (1998). "The neuregulin, glial growth factor 2, diminishes autoimmune demyelination and enhances remyelination in a chronic relapsing model for multiple sclerosis." Proc Natl Acad Sci U S A**95**(17): 10100-10105.
- Canto, C., A. V. Chibalin, et al. (2006). "Neuregulins mediate calcium-induced glucose transport during muscle contraction." J Biol Chem**281**(31): 21690-21697.
- Canto, C., S. Pich, et al. (2007). "Neuregulins increase mitochondrial oxidative capacity and insulin sensitivity in skeletal muscle cells." Diabetes**56**(9): 2185-2193.
- Canto, C., E. Suarez, et al. (2004). "Neuregulin signaling on glucose transport in muscle cells." J Biol Chem**279**(13): 12260-12268.
- Carpenter, G. (2000). "EGF receptor transactivation mediated by the proteolytic production of EGF-like agonists." Sci STKE**2000**(15): pe1.
- Carroll, T. J., S. Riek, et al. (2001). "Neural adaptations to resistance training: implications for movement control." Sports Med**31**(12): 829-840.

- Carver, R. S., P. M. Mathew, et al. (1997). "Hepatic expression of ErbB3 is repressed by insulin in a pathway sensitive to PI-3 kinase inhibitors." Endocrinology**138**(12): 5195-5201.
- Carver, R. S., M. X. Sliwkowski, et al. (1996). "Insulin regulates heregulin binding and ErbB3 expression in rat hepatocytes." J Biol Chem**271**(23): 13491-13496.
- Carver, R. S., M. C. Stevenson, et al. (2002). "Diverse expression of ErbB receptor proteins during rat liver development and regeneration." Gastroenterology**123**(6): 2017-2027.
- Castello, L., M. Maina, et al. (2011). "Alternate-day fasting reverses the age-associated hypertrophy phenotype in rat heart by influencing the ERK and PI3K signaling pathways." Mech Ageing Dev**132**(6-7): 305-314.
- Cernadas, M. R., L. Sanchez de Miguel, et al. (1998). "Expression of constitutive and inducible nitric oxide synthases in the vascular wall of young and aging rats." Circ Res**83**(3): 279-286.
- Chakkalakal, J. and A. Brack (2012). "Extrinsic Regulation of Satellite Cell Function and Muscle Regeneration Capacity during Aging." J Stem Cell Res Ther**Suppl 11**: 001.
- Chaudhury, A. R., K. M. Gerecke, et al. (2003). "Neuregulin-1 and erbB4 immunoreactivity is associated with neuritic plaques in Alzheimer disease brain and in a transgenic model of Alzheimer disease." J Neuropathol Exp Neurol**62**(1): 42-54.
- Chen, S. A., M. H. Tsai, et al. (2000). "Induction of antitumor immunity with combination of HER2/neu DNA vaccine and interleukin 2 gene-modified tumor vaccine." Clin Cancer Res**6**(11): 4381-4388.
- Chen, Y. J., M. A. Johnson, et al. (2008). "Type III neuregulin-1 is required for normal sensorimotor gating, memory-related behaviors, and corticostriatal circuit components." J Neurosci**28**(27): 6872-6883.
- Cheng, A., Y. Hou, et al. (2010). "Mitochondria and neuroplasticity." ASN Neuro**2**(5): e00045.
- Citri, A. and Y. Yarden (2006). "EGF-ERBB signalling: towards the systems level." Nat Rev Mol Cell Biol**7**(7): 505-516.
- Clark, B. C. and T. M. Manini (2008). "Sarcopenia =/= dynapenia." J Gerontol A Biol Sci Med Sci**63**(8): 829-834.
- Clement, C. M., L. K. Thomas, et al. (2007). "Neuregulin-1 attenuates neointimal formation following vascular injury and inhibits the proliferation of vascular smooth muscle cells." J Vasc Res**44**(4): 303-312.
- Coen, P. M., S. A. Jubrias, et al. (2013). "Skeletal muscle mitochondrial energetics are associated with maximal aerobic capacity and walking speed in older adults." J Gerontol A Biol Sci Med Sci**68**(4): 447-455.
- Coleman, M. (2011). "Molecular signaling how do axons die?" Adv Genet**73**: 185-217.
- Conboy, I. M., M. J. Conboy, et al. (2003). "Notch-mediated restoration of regenerative potential to aged muscle." Science**302**(5650): 1575-1577.
- Conley, K. E., S. A. Jubrias, et al. (2000). "Oxidative capacity and ageing in human muscle." J Physiol**526 Pt 1**: 203-210.
- Cooper, D. R., T. Ishizuka, et al. (1990). "Protein kinase C activation patterns are determined by methodological variations. Studies of insulin action in BC3H-1 myocytes and rat adipose tissue." Biochim Biophys Acta**1054**(1): 95-102.
- Corbi, G., V. Conti, et al. (2013). "Adrenergic signaling and oxidative stress: a role for sirtuins?" Front Physiol**4**: 324.

- Cote, G. M., T. A. Miller, et al. (2005). "Neuregulin-1alpha and beta isoform expression in cardiac microvascular endothelial cells and function in cardiac myocytes in vitro." Exp Cell Res**311**(1): 135-146.
- Crane, J. D., M. C. Devries, et al. (2010). "The effect of aging on human skeletal muscle mitochondrial and intramyocellular lipid ultrastructure." J Gerontol A Biol Sci Med Sci**65**(2): 119-128.
- Cree, L. M., S. K. Patel, et al. (2008). "Age-related decline in mitochondrial DNA copy number in isolated human pancreatic islets." Diabetologia**51**(8): 1440-1443.
- Cree, M. G., B. R. Newcomer, et al. (2004). "Intramuscular and liver triglycerides are increased in the elderly." J Clin Endocrinol Metab**89**(8): 3864-3871.
- Crone, S. A., Y. Y. Zhao, et al. (2002). "ErbB2 is essential in the prevention of dilated cardiomyopathy." Nat Med**8**(5): 459-465.
- Csiszar, A., M. Wang, et al. (2008). "Inflammation and endothelial dysfunction during aging: role of NF-kappaB." J Appl Physiol (1985)**105**(4): 1333-1341.
- Curry, D. L., G. Reaven, et al. (1984). "Glucose-induced insulin secretion by perfused pancreas of 2- and 12-mo-old Fischer 344 rats." Am J Physiol**247**(3 Pt 1): E385-388.
- Cuthbertson, D., K. Smith, et al. (2005). "Anabolic signaling deficits underlie amino acid resistance of wasting, aging muscle." FASEB J**19**(3): 422-424.
- Cuthbertson, L., J. Powers, et al. (2005). "The C-terminal domain of the nucleotide-binding domain protein Wzt determines substrate specificity in the ATP-binding cassette transporter for the lipopolysaccharide O-antigens in Escherichia coli serotypes O8 and O9a." J Biol Chem**280**(34): 30310-30319.
- D'Souza, R. F., J. F. Marworth, et al. (2014). "Dose-dependent increases in p70S6K phosphorylation and intramuscular branched-chain amino acids in older men following resistance exercise and protein intake." Physiol Rep**2**(8).
- Dai, D. F., S. C. Johnson, et al. (2011). "Mitochondrial oxidative stress mediates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and Galphaq overexpression-induced heart failure." Circ Res**108**(7): 837-846.
- Dai, G. Z. (2009). "[What have we learned from the evolution of chronic heart failure guidelines in the 21st century]." Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi**37**(10): 867-869.
- Davidson, M. B. (1979). "The effect of aging on carbohydrate metabolism: a review of the English literature and a practical approach to the diagnosis of diabetes mellitus in the elderly." Metabolism**28**(6): 688-705.
- Day, K., G. Shefer, et al. (2010). "The depletion of skeletal muscle satellite cells with age is concomitant with reduced capacity of single progenitors to produce reserve progeny." Dev Biol**340**(2): 330-343.
- De Haan, A., C. J. de Ruiter, et al. (1993). "Age-related changes in force and efficiency in rat skeletal muscle." Acta Physiol Scand**147**(4): 347-355.
- De Solis, A. J., T. Fernandez-Agullo, et al. (2012). "Impairment of skeletal muscle insulin action with aging in Wistar rats: role of leptin and caloric restriction." Mech Ageing Dev**133**(5): 306-316.
- De Tata, V. (2014). "Age-related impairment of pancreatic Beta-cell function: pathophysiological and cellular mechanisms." Front Endocrinol (Lausanne)**5**: 138.
- Deakin, I. H., A. J. Law, et al. (2009). "Behavioural characterization of neuregulin 1 type I overexpressing transgenic mice." Neuroreport**20**(17): 1523-1528.

- Deakin, I. H., W. Nissen, et al. (2012). "Transgenic overexpression of the type I isoform of neuregulin 1 affects working memory and hippocampal oscillations but not long-term potentiation." Cereb Cortex**22**(7): 1520-1529.
- DeFronzo, R. A. (1979). "Glucose intolerance and aging: evidence for tissue insensitivity to insulin." Diabetes**28**(12): 1095-1101.
- DeFronzo, R. A. (1981). "Glucose intolerance and aging." Diabetes Care**4**(4): 493-501.
- DeFronzo, R. A., A. Alvestrand, et al. (1981). "Insulin resistance in uremia." J Clin Invest**67**(2): 563-568.
- DeFronzo, R. A. and D. Tripathy (2009). "Skeletal muscle insulin resistance is the primary defect in type 2 diabetes." Diabetes Care**32 Suppl 2**: S157-163.
- Dela, F. and J. W. Helge (2013). "Insulin resistance and mitochondrial function in skeletal muscle." Int J Biochem Cell Biol**45**(1): 11-15.
- Deschenes, M. R. (2011). "Motor unit and neuromuscular junction remodeling with aging." Curr Aging Sci**4**(3): 209-220.
- Di Iorio, A., M. Abate, et al. (2006). "Sarcopenia: age-related skeletal muscle changes from determinants to physical disability." Int J Immunopathol Pharmacol**19**(4): 703-719.
- Diaz-Rodriguez, E., A. Esparis-Ogando, et al. (2000). "Stimulation of cleavage of membrane proteins by calmodulin inhibitors." Biochem J**346 Pt 2**: 359-367.
- Dickerson, J. W., A. M. Hemmerle, et al. (2009). "Decreased expression of ErbB4 and tyrosine hydroxylase mRNA and protein in the ventral midbrain of aged rats." Neuroscience**163**(1): 482-489.
- Dickinson, J. M., E. Volpi, et al. (2013). "Exercise and nutrition to target protein synthesis impairments in aging skeletal muscle." Exerc Sport Sci Rev**41**(4): 216-223.
- Doggen, K., L. Ray, et al. (2009). "Ventricular ErbB2/ErbB4 activation and downstream signaling in pacing-induced heart failure." J Mol Cell Cardiol**46**(1): 33-38.
- Dokken, B. B., V. Saengsirisuwan, et al. (2008). "Oxidative stress-induced insulin resistance in rat skeletal muscle: role of glycogen synthase kinase-3." Am J Physiol Endocrinol Metab**294**(3): E615-621.
- Douen, A. G., T. Ramlal, et al. (1990). "Exercise induces recruitment of the "insulin-responsive glucose transporter". Evidence for distinct intracellular insulin- and exercise-recruitable transporter pools in skeletal muscle." J Biol Chem**265**(23): 13427-13430.
- Drummond, M. J., H. C. Dreyer, et al. (2008). "Skeletal muscle protein anabolic response to resistance exercise and essential amino acids is delayed with aging." J Appl Physiol (1985)**104**(5): 1452-1461.
- Drummond, M. J., J. J. McCarthy, et al. (2008). "Aging differentially affects human skeletal muscle microRNA expression at rest and after an anabolic stimulus of resistance exercise and essential amino acids." Am J Physiol Endocrinol Metab**295**(6): E1333-1340.
- Du, Y., H. Yang, et al. (2012). "Conformational transition and energy landscape of ErbB4 activated by neuregulin1beta: one microsecond molecular dynamics simulations." J Am Chem Soc**134**(15): 6720-6731.
- Duffy, L., E. Cappas, et al. (2008). "Behavioral profile of a heterozygous mutant mouse model for EGF-like domain neuregulin 1." Behav Neurosci**122**(4): 748-759.
- Edrey, Y. H., D. Casper, et al. (2012). "Sustained high levels of neuregulin-1 in the longest-lived rodents; a key determinant of rodent longevity." Aging Cell**11**(2): 213-222.

- Eguchi, T., Y. Ishikawa, et al. (1998). "Mechanism underlying histamine-induced desensitization of amylase secretion in rat parotid glands." Br J Pharmacol**124**(7): 1523-1533.
- Ehrlichman, R. S., S. N. Luminais, et al. (2009). "Neuregulin 1 transgenic mice display reduced mismatch negativity, contextual fear conditioning and social interactions." Brain Res**1294**: 116-127.
- Ehsani, A. A. (1987). "Cardiovascular adaptations to exercise training in the elderly." Fed Proc**46**(5): 1840-1843.
- Elenius, K., G. Corfas, et al. (1997). "A novel juxtamembrane domain isoform of HER4/ErbB4. Isoform-specific tissue distribution and differential processing in response to phorbol ester." J Biol Chem**272**(42): 26761-26768.
- Eliasson, L., F. Abdulkader, et al. (2008). "Novel aspects of the molecular mechanisms controlling insulin secretion." J Physiol**586**(14): 3313-3324.
- Emre, H., S. B. Tekin, et al. (2013). "Investigation of ErbB-2 overexpression on patients with gastric cancer in Eastern Anatolia of Turkey." Turk J Gastroenterol**24**(3): 211-217.
- Ennequin, G., N. Boisseau, et al. (2015). "Neuregulin 1 affects leptin levels, food intake and weight gain in normal-weight, but not obese, db/db mice." Diabetes Metab**41**(2): 168-172.
- Ennequin, G., N. Boisseau, et al. (2015). "Exercise training and return to a well-balanced diet activate the neuregulin 1/ErbB pathway in skeletal muscle of obese rats." J Physiol**593**(12): 2665-2677.
- Erickson, S. L., K. S. O'Shea, et al. (1997). "ErbB3 is required for normal cerebellar and cardiac development: a comparison with ErbB2- and heregulin-deficient mice." Development**124**(24): 4999-5011.
- Escher, P., E. Lacazette, et al. (2005). "Synapses form in skeletal muscles lacking neuregulin receptors." Science**308**(5730): 1920-1923.
- Esler, M. D., A. G. Turner, et al. (1995). "Aging effects on human sympathetic neuronal function." Am J Physiol**268**(1 Pt 2): R278-285.
- Evans, W. J. (1995). "What is sarcopenia?" J Gerontol A Biol Sci Med Sci**50 Spec No**: 5-8.
- Falls, D. L. (2003). "Neuregulins: functions, forms, and signaling strategies." Exp Cell Res**284**(1): 14-30.
- Falls, D. L., D. A. Harris, et al. (1990). "Mr 42,000 ARIA: a protein that may regulate the accumulation of acetylcholine receptors at developing chick neuromuscular junctions." Cold Spring Harb Symp Quant Biol**55**: 397-406.
- Falls, D. L., K. M. Rosen, et al. (1993). "ARIA, a protein that stimulates acetylcholine receptor synthesis, is a member of the neu ligand family." Cell**72**(5): 801-815.
- Feldman, A. M., B. H. Lorell, et al. (2000). "Trastuzumab in the treatment of metastatic breast cancer : anticancer therapy versus cardiotoxicity." Circulation**102**(3): 272-274.
- Felig, P. and J. Wahren (1971). "Influence of endogenous insulin secretion on splanchnic glucose and amino acid metabolism in man." J Clin Invest**50**(8): 1702-1711.
- Feridooni, H. A., K. M. Dibb, et al. (2015). "How cardiomyocyte excitation, calcium release and contraction become altered with age." J Mol Cell Cardiol**83**: 62-72.
- Fernandez-Real, J. M., J. A. Menendez, et al. (2010). "Serum HER-2 concentration is associated with insulin resistance and decreases after weight loss." Nutr Metab (Lond)**7**: 14.
- Fiaturi, N., A. Ritzkat, et al. (2014). "Dissociated presenilin-1 and TACE processing of ErbB4 in lung alveolar type II cell differentiation." Biochim Biophys Acta**1843**(4): 797-805.

- Finch, S. C. (1994). "How long can we live?" Yale J Biol Med**67**(1-2): 15-21.
- Fink, R. I., O. G. Kolterman, et al. (1983). "Mechanisms of insulin resistance in aging." J Clin Invest**71**(6): 1523-1535.
- Fleck, D., A. N. Garratt, et al. (2012). "BACE1 dependent neuregulin processing: review." Curr Alzheimer Res**9**(2): 178-183.
- Fleck, D., F. van Bebber, et al. (2013). "Dual cleavage of neuregulin 1 type III by BACE1 and ADAM17 liberates its EGF-like domain and allows paracrine signaling." J Neurosci**33**(18): 7856-7869.
- Fledrich, R., R. M. Stassart, et al. (2014). "Soluble neuregulin-1 modulates disease pathogenesis in rodent models of Charcot-Marie-Tooth disease 1A." Nat Med**20**(9): 1055-1061.
- Fleg, J. L., D. E. Forman, et al. (2013). "Secondary prevention of atherosclerotic cardiovascular disease in older adults: a scientific statement from the American Heart Association." Circulation**128**(22): 2422-2446.
- Fleg, J. L. and E. G. Lakatta (1988). "Role of muscle loss in the age-associated reduction in VO2 max." J Appl Physiol (1985)**65**(3): 1147-1151.
- Fleg, J. L., S. Schulman, et al. (1994). "Effects of acute beta-adrenergic receptor blockade on age-associated changes in cardiovascular performance during dynamic exercise." Circulation**90**(5): 2333-2341.
- Florini, J. R., D. S. Samuel, et al. (1996). "Stimulation of myogenic differentiation by a neuregulin, glial growth factor 2. Are neuregulins the long-sought muscle trophic factors secreted by nerves?" J Biol Chem**271**(22): 12699-12702.
- Foo, R. S., K. Mani, et al. (2005). "Death begets failure in the heart." J Clin Invest**115**(3): 565-571.
- Ford, B. D., B. Han, et al. (2003). "Differentiation-dependent regulation of skeletal myogenesis by neuregulin-1." Biochem Biophys Res Commun**306**(1): 276-281.
- Freeman, C., K. Karoly, et al. (1973). "Impairments in availability of insulin to liver in vivo and in binding of insulin to purified hepatic plasma membrane during aging." Biochem Biophys Res Commun**54**(4): 1573-1580.
- Freese, C., A. N. Garratt, et al. (2009). "The effects of alpha-secretase ADAM10 on the proteolysis of neuregulin-1." FEBS J**276**(6): 1568-1580.
- Fricker, F. R., N. Lago, et al. (2011). "Axonally derived neuregulin-1 is required for remyelination and regeneration after nerve injury in adulthood." J Neurosci**31**(9): 3225-3233.
- Frolov, A., K. Schuller, et al. (2007). "ErbB3 expression and dimerization with EGFR influence pancreatic cancer cell sensitivity to erlotinib." Cancer Biol Ther**6**(4): 548-554.
- Fry, C. S., M. J. Drummond, et al. (2011). "Aging impairs contraction-induced human skeletal muscle mTORC1 signaling and protein synthesis." Skelet Muscle**1**(1): 11.
- Fry, C. S., J. D. Lee, et al. (2015). "Inducible depletion of satellite cells in adult, sedentary mice impairs muscle regenerative capacity without affecting sarcopenia." Nat Med**21**(1): 76-80.
- Fujita, S., E. L. Glynn, et al. (2009). "Supraphysiological hyperinsulinaemia is necessary to stimulate skeletal muscle protein anabolism in older adults: evidence of a true age-related insulin resistance of muscle protein metabolism." Diabetologia**52**(9): 1889-1898.

- Fujita, S., B. B. Rasmussen, et al. (2007). "Aerobic exercise overcomes the age-related insulin resistance of muscle protein metabolism by improving endothelial function and Akt/mammalian target of rapamycin signaling." Diabetes**56**(6): 1615-1622.
- Fukazawa, R., T. A. Miller, et al. (2003). "Neuregulin-1 protects ventricular myocytes from anthracycline-induced apoptosis via erbB4-dependent activation of PI3-kinase/Akt." J Mol Cell Cardiol**35**(12): 1473-1479.
- Fukazawa, T., M. Matsumoto, et al. (2013). "Electrical stimulation accelerates neuromuscular junction formation through ADAM19/neuregulin/ErbB signaling in vitro." Neurosci Lett**545**: 29-34.
- Funai, K., J. D. Parkington, et al. (2006). "Age-associated decrease in contraction-induced activation of downstream targets of Akt/mTOR signaling in skeletal muscle." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**290**(4): R1080-1086.
- Gabriely, I., X. H. Ma, et al. (2002). "Leptin resistance during aging is independent of fat mass." Diabetes**51**(4): 1016-1021.
- Gan, J., H. J. Sonntag, et al. (2015). "Integrative Analysis of the Developing Postnatal Mouse Heart Transcriptome." PLoS One**10**(7): e0133288.
- Gao, R., J. Zhang, et al. (2010). "A Phase II, randomized, double-blind, multicenter, based on standard therapy, placebo-controlled study of the efficacy and safety of recombinant human neuregulin-1 in patients with chronic heart failure." J Am Coll Cardiol**55**(18): 1907-1914.
- Garcia-Rivello, H., J. Taranda, et al. (2005). "Dilated cardiomyopathy in Erb-b4-deficient ventricular muscle." Am J Physiol Heart Circ Physiol**289**(3): H1153-1160.
- Gardner, C. D., S. Eguchi, et al. (2003). "Hydrogen peroxide inhibits insulin signaling in vascular smooth muscle cells." Exp Biol Med (Maywood)**228**(7): 836-842.
- Garratt, A. N., S. Britsch, et al. (2000). "Neuregulin, a factor with many functions in the life of a schwann cell." Bioessays**22**(11): 987-996.
- Garrett, T. P., N. M. McKern, et al. (2003). "The crystal structure of a truncated ErbB2 ectodomain reveals an active conformation, poised to interact with other ErbB receptors." Mol Cell**11**(2): 495-505.
- Garrett, T. P., N. M. McKern, et al. (2002). "Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor alpha." Cell**110**(6): 763-773.
- Gassmann, M., F. Casagrande, et al. (1995). "Aberrant neural and cardiac development in mice lacking the ErbB4 neuregulin receptor." Nature**378**(6555): 390-394.
- Geisberg, C. A., G. Wang, et al. (2011). "Circulating neuregulin-1beta levels vary according to the angiographic severity of coronary artery disease and ischemia." Coron Artery Dis**22**(8): 577-582.
- George, T., C. P. Velloso, et al. (2010). "Sera from young and older humans equally sustain proliferation and differentiation of human myoblasts." Exp Gerontol**45**(11): 875-881.
- Gerlai, R., P. Pisacane, et al. (2000). "Heregulin, but not ErbB2 or ErbB3, heterozygous mutant mice exhibit hyperactivity in multiple behavioral tasks." Behav Brain Res**109**(2): 219-227.
- Gerstenblith, G., J. Frederiksen, et al. (1977). "Echocardiographic assessment of a normal adult aging population." Circulation**56**(2): 273-278.
- Gianani, R. (2011). "Beta cell regeneration in human pancreas." Semin Immunopathol**33**(1): 23-27.

- Giraud, M. N., M. Fluck, et al. (2005). "Expressional reprogramming of survival pathways in rat cardiocytes by neuregulin-1beta." J Appl Physiol (1985)**99**(1): 313-322.
- Giri, D. K., M. Ali-Seyed, et al. (2005). "Endosomal transport of ErbB-2: mechanism for nuclear entry of the cell surface receptor." Mol Cell Biol**25**(24): 11005-11018.
- Glass, D. J. (2010). "PI3 kinase regulation of skeletal muscle hypertrophy and atrophy." Curr Top Microbiol Immunol**346**: 267-278.
- Go, R. C., R. T. Perry, et al. (2005). "Neuregulin-1 polymorphism in late onset Alzheimer's disease families with psychoses." Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet**139B**(1): 28-32.
- Goffart, S., J. C. von Kleist-Retzow, et al. (2004). "Regulation of mitochondrial proliferation in the heart: power-plant failure contributes to cardiac failure in hypertrophy." Cardiovasc Res**64**(2): 198-207.
- Goldspink, G., K. Fernandes, et al. (1994). "Age-related changes in collagen gene expression in the muscles of mdx dystrophic and normal mice." Neuromuscul Disord**4**(3): 183-191.
- Goodearl, A. D., J. B. Davis, et al. (1993). "Purification of multiple forms of glial growth factor." J Biol Chem**268**(24): 18095-18102.
- Gordon, T., J. Hegedus, et al. (2004). "Adaptive and maladaptive motor axonal sprouting in aging and motoneuron disease." Neurol Res**26**(2): 174-185.
- Goto, M., S. Terada, et al. (2000). "cDNA Cloning and mRNA analysis of PGC-1 in epitrochlearis muscle in swimming-exercised rats." Biochem Biophys Res Commun**274**(2): 350-354.
- Goulet, E. D., A. Hassaine, et al. (2009). "Frailty in the elderly is associated with insulin resistance of glucose metabolism in the postabsorptive state only in the presence of increased abdominal fat." Exp Gerontol**44**(11): 740-744.
- Gramolini, A. O., L. M. Angus, et al. (1999). "Induction of utrophin gene expression by heregulin in skeletal muscle cells: role of the N-box motif and GA binding protein." Proc Natl Acad Sci U S A**96**(6): 3223-3227.
- Grefte, S., A. M. Kuijpers-Jagtman, et al. (2007). "Skeletal muscle development and regeneration." Stem Cells Dev**16**(5): 857-868.
- Gschwind, A., N. Prenzel, et al. (2002). "Lysophosphatidic acid-induced squamous cell carcinoma cell proliferation and motility involves epidermal growth factor receptor signal transactivation." Cancer Res**62**(21): 6329-6336.
- Gschwind, A., E. Zwick, et al. (2001). "Cell communication networks: epidermal growth factor receptor transactivation as the paradigm for interreceptor signal transmission." Oncogene**20**(13): 1594-1600.
- Gu, X., X. Liu, et al. (2010). "Cardiac functional improvement in rats with myocardial infarction by up-regulating cardiac myosin light chain kinase with neuregulin." Cardiovasc Res**88**(2): 334-343.
- Gu, Z., Y. Du, et al. (2012). "Effect of aging on islet beta-cell function and its mechanisms in Wistar rats." Age (Dordr)**34**(6): 1393-1403.
- Gui, C., L. Zhu, et al. (2012). "Neuregulin-1/ErbB signaling is impaired in the rat model of diabetic cardiomyopathy." Cardiovasc Pathol**21**(5): 414-420.
- Guillet, C., A. Zangarelli, et al. (2004). "Whole body protein breakdown is less inhibited by insulin, but still responsive to amino acid, in nondiabetic elderly subjects." J Clin Endocrinol Metab**89**(12): 6017-6024.

- Guma, A., V. Martinez-Redondo, et al. (2010). "Emerging role of neuregulin as a modulator of muscle metabolism." Am J Physiol Endocrinol Metab**298**(4): E742-750.
- Guo, X., M. Yu, et al. (2011). "mTOR complex 2 activation by reconstituted high-density lipoprotein prevents senescence in circulating angiogenic cells." Arterioscler Thromb Vasc Biol**31**(6): 1421-1429.
- Guo, Y. F., X. X. Zhang, et al. (2012). "Neuregulin-1 attenuates mitochondrial dysfunction in a rat model of heart failure." Chin Med J (Engl)**125**(5): 807-814.
- Gupta, G., L. She, et al. (2000). "Aging does not contribute to the decline in insulin action on storage of muscle glycogen in rats." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**278**(1): R111-117.
- Gutmann, E. (1976). "Neurotrophic relations." Annu Rev Physiol**38**: 177-216.
- Guy, P. M., J. V. Platko, et al. (1994). "Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity." Proc Natl Acad Sci U S A**91**(17): 8132-8136.
- Haddad, F. and G. R. Adams (2006). "Aging-sensitive cellular and molecular mechanisms associated with skeletal muscle hypertrophy." J Appl Physiol (1985)**100**(4): 1188-1203.
- Hahn, C. G., H. Y. Wang, et al. (2006). "Altered neuregulin 1-erbB4 signaling contributes to NMDA receptor hypofunction in schizophrenia." Nat Med**12**(7): 824-828.
- Han, M. W., J. L. Roh, et al. (2015). "Prognostic factors and outcome analysis of salivary duct carcinoma." Auris Nasus Larynx**42**(6): 472-477.
- Handschin, C., Y. M. Kobayashi, et al. (2007). "PGC-1alpha regulates the neuromuscular junction program and ameliorates Duchenne muscular dystrophy." Genes Dev**21**(7): 770-783.
- Handschin, C. and B. M. Spiegelman (2006). "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 coactivators, energy homeostasis, and metabolism." Endocr Rev**27**(7): 728-735.
- Harrison, P. J. and A. J. Law (2006). "Neuregulin 1 and schizophrenia: genetics, gene expression, and neurobiology." Biol Psychiatry**60**(2): 132-140.
- Hawke, T. J. and D. J. Garry (2001). "Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology." J Appl Physiol (1985)**91**(2): 534-551.
- Hayworth, C. R., S. E. Moody, et al. (2006). "Induction of neuregulin signaling in mouse schwann cells in vivo mimics responses to denervation." J Neurosci**26**(25): 6873-6884.
- He, K., T. Zhou, et al. (2014). "Dynamic regulation of genetic pathways and targets during aging in *Caenorhabditis elegans*." Aging (Albany NY)**6**(3): 215-230.
- Hedhli, N., Q. Huang, et al. (2011). "Endothelium-derived neuregulin protects the heart against ischemic injury." Circulation**123**(20): 2254-2262.
- Hedhli, N., A. Kalinowski, et al. (2014). "Cardiovascular effects of neuregulin-1/ErbB signaling: role in vascular signaling and angiogenesis." Curr Pharm Des**20**(30): 4899-4905.
- Hees, P. S., J. L. Fleg, et al. (2002). "Left ventricular remodeling with age in normal men versus women: novel insights using three-dimensional magnetic resonance imaging." Am J Cardiol**90**(11): 1231-1236.
- Hellyer, N. J., K. Cheng, et al. (1998). "ErbB3 (HER3) interaction with the p85 regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase." Biochem J**333** ( Pt 3): 757-763.
- Hellyer, N. J., C. B. Mantilla, et al. (2006). "Neuregulin-dependent protein synthesis in C2C12 myotubes and rat diaphragm muscle." Am J Physiol Cell Physiol**291**(5): C1056-1061.

- Hemi, R., K. Paz, et al. (2002). "Transactivation of ErbB2 and ErbB3 by tumor necrosis factor- $\alpha$  and anisomycin leads to impaired insulin signaling through serine/threonine phosphorylation of IRS proteins." J Biol Chem**277**(11): 8961-8969.
- Hemi, R., Y. Yochananov, et al. (2011). "p38 mitogen-activated protein kinase-dependent transactivation of ErbB receptor family: a novel common mechanism for stress-induced IRS-1 serine phosphorylation and insulin resistance." Diabetes**60**(4): 1134-1145.
- Herndon, C. A., N. Ankenbruck, et al. (2014). "The Erk MAP kinase pathway is activated at muscle spindles and is required for induction of the muscle spindle-specific gene Egr3 by neuregulin1." J Neurosci Res**92**(2): 174-184.
- Heyworth, C. M., A. V. Wallace, et al. (1983). "Insulin and glucagon regulate the activation of two distinct membrane-bound cyclic AMP phosphodiesterases in hepatocytes." Biochem J**214**(1): 99-110.
- Hines, L. E. and J. E. Murphy (2011). "Potentially harmful drug-drug interactions in the elderly: a review." Am J Geriatr Pharmacother**9**(6): 364-377.
- Hirata, M., K. Sakuma, et al. (2007). "Increased expression of neuregulin-1 in differentiating muscle satellite cells and in motoneurons during muscle regeneration." Acta Neuropathol**113**(4): 451-459.
- Hirose, H., M. Takayama, et al. (2015). "Effects of Aging on Visceral and Subcutaneous Fat Areas and on Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance and Insulin Secretion Capacity in a Comprehensive Health Checkup." J Atheroscler Thromb.
- Ho, W. H., M. P. Armanini, et al. (1995). "Sensory and motor neuron-derived factor. A novel heregulin variant highly expressed in sensory and motor neurons." J Biol Chem**270**(24): 14523-14532.
- Hobai, I. A. and B. O'Rourke (2001). "Decreased sarcoplasmic reticulum calcium content is responsible for defective excitation-contraction coupling in canine heart failure." Circulation**103**(11): 1577-1584.
- Hollmen, M., J. A. Maatta, et al. (2009). "Suppression of breast cancer cell growth by a monoclonal antibody targeting cleavable ErbB4 isoforms." Oncogene**28**(10): 1309-1319.
- Holmes, W. E., M. X. Sliwkowski, et al. (1992). "Identification of heregulin, a specific activator of p185erbB2." Science**256**(5060): 1205-1210.
- Hook, P., V. Sriramoju, et al. (2001). "Effects of aging on actin sliding speed on myosin from single skeletal muscle cells of mice, rats, and humans." Am J Physiol Cell Physiol**280**(4): C782-788.
- Hsu, S. C. and M. C. Hung (2007). "Characterization of a novel tripartite nuclear localization sequence in the EGFR family." J Biol Chem**282**(14): 10432-10440.
- Huang, W. C., C. C. Chio, et al. (2002). "Superoxide anion-dependent Raf/MEK/ERK activation by peroxisome proliferator activated receptor gamma agonists 15-deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J(2), ciglitazone, and GW1929." Exp Cell Res**277**(2): 192-200.
- Ihm, S. H., H. J. Moon, et al. (2007). "Effect of aging on insulin secretory function and expression of beta cell function-related genes of islets." Diabetes Res Clin Pract**77 Suppl 1**: S150-154.
- Iivanainen, E., I. Paatero, et al. (2007). "Intra- and extracellular signaling by endothelial neuregulin-1." Exp Cell Res**313**(13): 2896-2909.

- lossa, S., M. P. Mollica, et al. (2004). "A possible link between skeletal muscle mitochondrial efficiency and age-induced insulin resistance." Diabetes**53**(11): 2861-2866.
- lozzo, P., H. Beck-Nielsen, et al. (1999). "Independent influence of age on basal insulin secretion in nondiabetic humans. European Group for the Study of Insulin Resistance." J Clin Endocrinol Metab**84**(3): 863-868.
- Jabbour, A., C. S. Hayward, et al. (2011). "Parenteral administration of recombinant human neuregulin-1 to patients with stable chronic heart failure produces favourable acute and chronic haemodynamic responses." Eur J Heart Fail**13**(1): 83-92.
- Jackson, R. A., M. I. Hawa, et al. (1988). "Influence of aging on hepatic and peripheral glucose metabolism in humans." Diabetes**37**(1): 119-129.
- Janczewski, A. M., H. A. Spurgeon, et al. (2002). "Action potential prolongation in cardiac myocytes of old rats is an adaptation to sustain youthful intracellular Ca<sup>2+</sup> regulation." J Mol Cell Cardiol**34**(6): 641-648.
- Jensen, G. L. (2008). "Inflammation: roles in aging and sarcopenia." JPEN J Parenter Enteral Nutr**32**(6): 656-659.
- Jo, S. A., X. Zhu, et al. (1995). "Neuregulins are concentrated at nerve-muscle synapses and activate ACh-receptor gene expression." Nature**373**(6510): 158-161.
- Jones, F. E. (2008). "HER4 intracellular domain (4ICD) activity in the developing mammary gland and breast cancer." J Mammary Gland Biol Neoplasia**13**(2): 247-258.
- Joseph, A. M., P. J. Adhihetty, et al. (2012). "The impact of aging on mitochondrial function and biogenesis pathways in skeletal muscle of sedentary high- and low-functioning elderly individuals." Aging Cell**11**(5): 801-809.
- Kadi, F., P. Schjerling, et al. (2004). "The effects of heavy resistance training and detraining on satellite cells in human skeletal muscles." J Physiol**558**(Pt 3): 1005-1012.
- Kajstura, J., K. Urbanek, et al. (2010). "Cardiomyogenesis in the adult human heart." Circ Res**107**(2): 305-315.
- Kalyani, R. R. and J. M. Egan (2013). "Diabetes and altered glucose metabolism with aging." Endocrinol Metab Clin North Am**42**(2): 333-347.
- Kao, W. T., Y. Wang, et al. (2010). "Common genetic variation in Neuregulin 3 (NRG3) influences risk for schizophrenia and impacts NRG3 expression in human brain." Proc Natl Acad Sci U S A**107**(35): 15619-15624.
- Karakelides, H., B. A. Irving, et al. (2010). "Age, obesity, and sex effects on insulin sensitivity and skeletal muscle mitochondrial function." Diabetes**59**(1): 89-97.
- Karl, T., L. Duffy, et al. (2007). "Altered motor activity, exploration and anxiety in heterozygous neuregulin 1 mutant mice: implications for understanding schizophrenia." Genes Brain Behav**6**(7): 677-687.
- Kato, T., A. Kasai, et al. (2010). "Phenotypic characterization of transgenic mice overexpressing neuregulin-1." PLoS One**5**(12): e14185.
- Khan, I. H., J. Zhao, et al. (2010). "Microbead arrays for the analysis of ErbB receptor tyrosine kinase activation and dimerization in breast cancer cells." Assay Drug Dev Technol**8**(1): 27-36.
- Kim, D., S. Chi, et al. (1999). "Neuregulin stimulates myogenic differentiation in an autocrine manner." J Biol Chem**274**(22): 15395-15400.
- Kimball, S. R. and L. S. Jefferson (2006). "Signaling pathways and molecular mechanisms through which branched-chain amino acids mediate translational control of protein synthesis." J Nutr**136**(1 Suppl): 227S-231S.

- Kimball, S. R., J. P. O'Malley, et al. (2004). "Assessment of biomarkers of protein anabolism in skeletal muscle during the life span of the rat: sarcopenia despite elevated protein synthesis." Am J Physiol Endocrinol Metab**287**(4): E772-780.
- King, L. E., Jr., R. E. Gates, et al. (1990). "Epidermal growth factor/transforming growth factor alpha receptors and psoriasis." J Invest Dermatol**95**(5 Suppl): 10S-12S.
- Klapper, L. N., S. Glathe, et al. (1999). "The ErbB-2/HER2 oncoprotein of human carcinomas may function solely as a shared coreceptor for multiple stroma-derived growth factors." Proc Natl Acad Sci U S A**96**(9): 4995-5000.
- Kloppel, G., M. Lohr, et al. (1985). "Islet pathology and the pathogenesis of type 1 and type 2 diabetes mellitus revisited." Surv Synth Pathol Res**4**(2): 110-125.
- Kohrt, W. M., J. P. Kirwan, et al. (1993). "Insulin resistance in aging is related to abdominal obesity." Diabetes**42**(2): 273-281.
- Koltai, E., N. Hart, et al. (2012). "Age-associated declines in mitochondrial biogenesis and protein quality control factors are minimized by exercise training." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**303**(2): R127-134.
- Komuro, A., M. Nagai, et al. (2003). "WW domain-containing protein YAP associates with ErbB-4 and acts as a co-transcriptional activator for the carboxyl-terminal fragment of ErbB-4 that translocates to the nucleus." J Biol Chem**278**(35): 33334-33341.
- Kong, M., C. Mounier, et al. (2003). "Gab2 tyrosine phosphorylation by a pleckstrin homology domain-independent mechanism: role in epidermal growth factor-induced mitogenesis." Mol Endocrinol**17**(5): 935-944.
- Kornblum, H. I., D. S. Yanni, et al. (2000). "Expression of the EGF receptor family members ErbB2, ErbB3, and ErbB4 in germinal zones of the developing brain and in neurosphere cultures containing CNS stem cells." Dev Neurosci**22**(1-2): 16-24.
- Koumakpayi, I. H., J. S. Diallo, et al. (2006). "Expression and nuclear localization of ErbB3 in prostate cancer." Clin Cancer Res**12**(9): 2730-2737.
- Kovacic, U., J. Sketelj, et al. (2009). "Chapter 26: Age-related differences in the reinnervation after peripheral nerve injury." Int Rev Neurobiol**87**: 465-482.
- Krag, T. O., S. Bogdanovich, et al. (2004). "Heregulin ameliorates the dystrophic phenotype in mdx mice." Proc Natl Acad Sci U S A**101**(38): 13856-13860.
- Kramer, R., N. Bucay, et al. (1996). "Neuregulins with an Ig-like domain are essential for mouse myocardial and neuronal development." Proc Natl Acad Sci U S A**93**(10): 4833-4838.
- Kraus, M. H., W. Issing, et al. (1989). "Isolation and characterization of ERBB3, a third member of the ERBB/epidermal growth factor receptor family: evidence for overexpression in a subset of human mammary tumors." Proc Natl Acad Sci U S A**86**(23): 9193-9197.
- Kuhlow, D., S. Florian, et al. (2010). "Telomerase deficiency impairs glucose metabolism and insulin secretion." Aging (Albany NY)**2**(10): 650-658.
- Kuramochi, Y., G. M. Cote, et al. (2004). "Cardiac endothelial cells regulate reactive oxygen species-induced cardiomyocyte apoptosis through neuregulin-1beta/erbB4 signaling." J Biol Chem**279**(49): 51141-51147.
- Kuramochi, Y., X. Guo, et al. (2006). "Neuregulin activates erbB2-dependent src/FAK signaling and cytoskeletal remodeling in isolated adult rat cardiac myocytes." J Mol Cell Cardiol**41**(2): 228-235.
- Ky, B., S. E. Kimmel, et al. (2009). "Neuregulin-1 beta is associated with disease severity and adverse outcomes in chronic heart failure." Circulation**120**(4): 310-317.

- Lakatta, E. G. and D. Levy (2003). "Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part I: aging arteries: a "set up" for vascular disease." Circulation**107**(1): 139-146.
- Lakatta, E. G. and D. Levy (2003). "Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part II: the aging heart in health: links to heart disease." Circulation**107**(2): 346-354.
- Lakatta, E. G. and S. J. Sollott (2002). "Perspectives on mammalian cardiovascular aging: humans to molecules." Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**132**(4): 699-721.
- Lauretani, F., C. R. Russo, et al. (2003). "Age-associated changes in skeletal muscles and their effect on mobility: an operational diagnosis of sarcopenia." J Appl Physiol (1985)**95**(5): 1851-1860.
- Laursen, P. B. (2010). "Training for intense exercise performance: high-intensity or high-volume training?" Scand J Med Sci Sports**20 Suppl 2**: 1-10.
- Lavasani, M., A. R. Robinson, et al. (2012). "Muscle-derived stem/progenitor cell dysfunction limits healthspan and lifespan in a murine progeria model." Nat Commun**3**: 608.
- Le Gall, J. Y. and R. Ardaillou (2009). "[The biology of aging]." Bull Acad Natl Med**193**(2): 365-402; discussion 402-364.
- Le Gall, S. M., T. Maretzky, et al. (2010). "ADAM17 is regulated by a rapid and reversible mechanism that controls access to its catalytic site." J Cell Sci**123**(Pt 22): 3913-3922.
- Lebrasseur, N. K., G. M. Cote, et al. (2003). "Regulation of neuregulin/ErbB signaling by contractile activity in skeletal muscle." Am J Physiol Cell Physiol**284**(5): C1149-1155.
- LeBrasseur, N. K., K. C. Mizer, et al. (2005). "The expression of neuregulin and erbB receptors in human skeletal muscle: effects of progressive resistance training." Eur J Appl Physiol**94**(4): 371-375.
- Lee, K. F., H. Simon, et al. (1995). "Requirement for neuregulin receptor erbB2 in neural and cardiac development." Nature**378**(6555): 394-398.
- Leger, B., W. Derave, et al. (2008). "Human sarcopenia reveals an increase in SOCS-3 and myostatin and a reduced efficiency of Akt phosphorylation." Rejuvenation Res**11**(1): 163-175B.
- Leitner, M. L., D. C. Molliver, et al. (1999). "Analysis of the retrograde transport of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), neurturin, and persephin suggests that in vivo signaling for the GDNF family is GFRalpha coreceptor-specific." J Neurosci**19**(21): 9322-9331.
- Lemke, G. E. and J. P. Brookes (1984). "Identification and purification of glial growth factor." J Neurosci**4**(1): 75-83.
- Lemmens, K. and G. W. De Keulenaer (2011). "Paving new paths for neuregulin-1-assisted cardiac regenerative medicine. Focus on "Improving murine embryonic stem cell differentiation into cardiomyocytes with neuregulin-1: differential expression of microRNA"." Am J Physiol Cell Physiol**301**(1): C16-17.
- Lemmens, K., K. Doggen, et al. (2007). "Role of neuregulin-1/ErbB signaling in cardiovascular physiology and disease: implications for therapy of heart failure." Circulation**116**(8): 954-960.
- Lemmens, K., K. Doggen, et al. (2011). "Activation of the neuregulin/ErbB system during physiological ventricular remodeling in pregnancy." Am J Physiol Heart Circ Physiol**300**(3): H931-942.
- Lemmens, K., P. Fransen, et al. (2004). "Neuregulin-1 induces a negative inotropic effect in cardiac muscle: role of nitric oxide synthase." Circulation**109**(3): 324-326.

- Lemmens, K., V. F. Segers, et al. (2006). "Role of neuregulin-1/ErbB2 signaling in endothelium-cardiomyocyte cross-talk." J Biol Chem**281**(28): 19469-19477.
- Leu, M., E. Bellmunt, et al. (2003). "ErbB2 regulates neuromuscular synapse formation and is essential for muscle spindle development." Development**130**(11): 2291-2301.
- Li, B., Z. Zheng, et al. (2011). "Therapeutic effects of neuregulin-1 in diabetic cardiomyopathy rats." Cardiovasc Diabetol**10**: 69.
- Li, D., D. A. Collier, et al. (2006). "Meta-analysis shows strong positive association of the neuregulin 1 (NRG1) gene with schizophrenia." Hum Mol Genet**15**(12): 1995-2002.
- Li, L., S. Cleary, et al. (2002). "The breast proto-oncogene, HRGalpha regulates epithelial proliferation and lobuloalveolar development in the mouse mammary gland." Oncogene**21**(32): 4900-4907.
- Li, L., A. Trifunovic, et al. (2014). "Defects in beta-cell Ca<sup>2+</sup> dynamics in age-induced diabetes." Diabetes**63**(12): 4100-4114.
- Li, Q. and J. A. Loeb (2001). "Neuregulin-heparan-sulfate proteoglycan interactions produce sustained erbB receptor activation required for the induction of acetylcholine receptors in muscle." J Biol Chem**276**(41): 38068-38075.
- Li, Y., Y. Lee, et al. (2011). "Changes in aging mouse neuromuscular junctions are explained by degeneration and regeneration of muscle fiber segments at the synapse." J Neurosci**31**(42): 14910-14919.
- Liang, X., Y. Ding, et al. (2015). "Activation of NRG1-ERBB4 signaling potentiates mesenchymal stem cell-mediated myocardial repairs following myocardial infarction." Cell Death Dis**6**: e1765.
- Lin, S. Y., K. Makino, et al. (2001). "Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor." Nat Cell Biol**3**(9): 802-808.
- Lindstrom, J. and J. Tuomilehto (2003). "The diabetes risk score: a practical tool to predict type 2 diabetes risk." Diabetes Care**26**(3): 725-731.
- Ling, F. and T. Shibata (2004). "Mhr1p-dependent concatemeric mitochondrial DNA formation for generating yeast mitochondrial homoplasmic cells." Mol Biol Cell**15**(1): 310-322.
- Linggi, B., Q. C. Cheng, et al. (2006). "The ErbB-4 s80 intracellular domain is a constitutively active tyrosine kinase." Oncogene**25**(1): 160-163.
- Liu, C. Y., H. D. Zhou, et al. (2009). "Metabolic syndrome and cognitive impairment amongst elderly people in Chinese population: a cross-sectional study." Eur J Neuro**16**(9): 1022-1027.
- Liu, F. F., J. R. Stone, et al. (2005). "Heterozygous knockout of neuregulin-1 gene in mice exacerbates doxorubicin-induced heart failure." Am J Physiol Heart Circ Physiol**289**(2): H660-666.
- Liu, H., S. E. Chen, et al. (2010). "TIMP3: a physiological regulator of adult myogenesis." J Cell Sci**123**(Pt 17): 2914-2921.
- Liu, J., D. Nethery, et al. (2004). "Neuregulin-1 induces branching morphogenesis in the developing lung through a P13K signal pathway." Exp Lung Res**30**(6): 465-478.
- Liu, X., X. Gu, et al. (2006). "Neuregulin-1/erbB-activation improves cardiac function and survival in models of ischemic, dilated, and viral cardiomyopathy." J Am Coll Cardiol**48**(7): 1438-1447.
- Liu, X., H. Hwang, et al. (1998). "Domain-specific gene disruption reveals critical regulation of neuregulin signaling by its cytoplasmic tail." Proc Natl Acad Sci U S A**95**(22): 13024-13029.

- Lo, H. W., S. C. Hsu, et al. (2005). "Nuclear interaction of EGFR and STAT3 in the activation of the iNOS/NO pathway." Cancer Cell**7**(6): 575-589.
- Loffredo, F. S., A. P. Nikolova, et al. (2014). "Heart failure with preserved ejection fraction: molecular pathways of the aging myocardium." Circ Res**115**(1): 97-107.
- Lowenstein, E. J., R. J. Daly, et al. (1992). "The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling." Cell**70**(3): 431-442.
- Luo, X., W. He, et al. (2014). "Reversible overexpression of bace1-cleaved neuregulin-1 N-terminal fragment induces schizophrenia-like phenotypes in mice." Biol Psychiatry**76**(2): 120-127.
- Lynch, G. S. and J. G. Ryall (2008). "Role of beta-adrenoceptor signaling in skeletal muscle: implications for muscle wasting and disease." Physiol Rev**88**(2): 729-767.
- Maddux, B. A., W. See, et al. (2001). "Protection against oxidative stress-induced insulin resistance in rat L6 muscle cells by micromolar concentrations of alpha-lipoic acid." Diabetes**50**(2): 404-410.
- Maechler, P., E. D. Kennedy, et al. (1999). "Secretagogues modulate the calcium concentration in the endoplasmic reticulum of insulin-secreting cells. Studies in aequorin-expressing intact and permeabilized ins-1 cells." J Biol Chem**274**(18): 12583-12592.
- Maggio, M., F. Lauretani, et al. (2007). "Relationship between low levels of anabolic hormones and 6-year mortality in older men: the aging in the Chianti Area (InCHIANTI) study." Arch Intern Med**167**(20): 2249-2254.
- Magne, J., H. Mahjoub, et al. (2012). "Prognostic importance of exercise brain natriuretic peptide in asymptomatic degenerative mitral regurgitation." Eur J Heart Fail**14**(11): 1293-1302.
- Manini, T. M., S. L. Hong, et al. (2013). "Aging and muscle: a neuron's perspective." Curr Opin Clin Nutr Metab Care**16**(1): 21-26.
- Marballi, K., D. Cruz, et al. (2012). "Differential neuregulin 1 cleavage in the prefrontal cortex and hippocampus in schizophrenia and bipolar disorder: preliminary findings." PLoS One**7**(5): e36431.
- Marchionni, M. A., B. Cannella, et al. (1999). "Neuregulin in neuron/glia interactions in the central nervous system. GGF2 diminishes autoimmune demyelination, promotes oligodendrocyte progenitor expansion, and enhances remyelination." Adv Exp Med Biol**468**: 283-295.
- Marchionni, M. A., A. D. Goodearl, et al. (1993). "Glial growth factors are alternatively spliced erbB2 ligands expressed in the nervous system." Nature**362**(6418): 312-318.
- Marti, U. and A. Wells (2000). "The nuclear accumulation of a variant epidermal growth factor receptor (EGFR) lacking the transmembrane domain requires coexpression of a full-length EGFR." Mol Cell Biol Res Commun**3**(1): 8-14.
- Martin, V., S. Ratel, et al. (2013). "Whey proteins are more efficient than casein in the recovery of muscle functional properties following a casting induced muscle atrophy." PLoS One**8**(9): e75408.
- Marzetti, E., R. Calvani, et al. (2013). "Mitochondrial dysfunction and sarcopenia of aging: from signaling pathways to clinical trials." Int J Biochem Cell Biol**45**(10): 2288-2301.
- Massague, J. and A. Pandiella (1993). "Membrane-anchored growth factors." Annu Rev Biochem**62**: 515-541.
- Massie, C. and I. G. Mills (2006). "The developing role of receptors and adaptors." Nat Rev Cancer**6**(5): 403-409.

- Matsuse, H., C. Iwasa, et al. (2011). "Hybrid-training method increases muscle strength and mass in the forearm without adverse effect of hand function in healthy male subjects." Kurume Med J**57**(4): 125-132.
- Mei, L. and K. A. Nave (2014). "Neuregulin-ERBB signaling in the nervous system and neuropsychiatric diseases." Neuron**83**(1): 27-49.
- Mei, L. and W. C. Xiong (2008). "Neuregulin 1 in neural development, synaptic plasticity and schizophrenia." Nat Rev Neurosci**9**(6): 437-452.
- Meier, T., F. Masciulli, et al. (1998). "Agrin can mediate acetylcholine receptor gene expression in muscle by aggregation of muscle-derived neuregulins." J Cell Biol**141**(3): 715-726.
- Melcangi, R. C., S. Giatti, et al. (2011). "Role of neuroactive steroids in the peripheral nervous system." Front Endocrinol (Lausanne)**2**: 104.
- Meyer, D. and C. Birchmeier (1995). "Multiple essential functions of neuregulin in development." Nature**378**(6555): 386-390.
- Meyer, D., T. Yamaai, et al. (1997). "Isoform-specific expression and function of neuregulin." Development**124**(18): 3575-3586.
- Michalopoulos, G. K. (2013). "Principles of liver regeneration and growth homeostasis." Compr Physiol**3**(1): 485-513.
- Miettinen, P. J., J. E. Berger, et al. (1995). "Epithelial immaturity and multiorgan failure in mice lacking epidermal growth factor receptor." Nature**376**(6538): 337-341.
- Miettinen, P. J., J. R. Chin, et al. (1999). "Epidermal growth factor receptor function is necessary for normal craniofacial development and palate closure." Nat Genet**22**(1): 69-73.
- Milewska, M. and W. Kolch (2014). "Mig-6 participates in the regulation of cell senescence and retinoblastoma protein phosphorylation." Cell Signal**26**(9): 1870-1877.
- Miller, T. A., B. Icli, et al. (2009). "Palmitate alters neuregulin signaling and biology in cardiac myocytes." Biochem Biophys Res Commun**379**(1): 32-37.
- Miyamoto, S., M. Izumi, et al. (2000). "Xestospongins C, a selective and membrane-permeable inhibitor of IP(3) receptor, attenuates the positive inotropic effect of alpha-adrenergic stimulation in guinea-pig papillary muscle." Br J Pharmacol**130**(3): 650-654.
- Miyatake, K., M. Okamoto, et al. (1984). "Augmentation of atrial contribution to left ventricular inflow with aging as assessed by intracardiac Doppler flowmetry." Am J Cardiol**53**(4): 586-589.
- Monroy, A., S. Kamath, et al. (2009). "Impaired regulation of the TNF-alpha converting enzyme/tissue inhibitor of metalloproteinase 3 proteolytic system in skeletal muscle of obese type 2 diabetic patients: a new mechanism of insulin resistance in humans." Diabetologia**52**(10): 2169-2181.
- Montero, J. C., R. Rodriguez-Barrueco, et al. (2008). "Neuregulins and cancer." Clin Cancer Res**14**(11): 3237-3241.
- Montero, J. C., L. Yuste, et al. (2000). "Differential shedding of transmembrane neuregulin isoforms by the tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme." Mol Cell Neurosci**16**(5): 631-648.
- Montero, J. C., L. Yuste, et al. (2002). "Mitogen-activated protein kinase-dependent and -independent routes control shedding of transmembrane growth factors through multiple secretases." Biochem J**363**(Pt 2): 211-221.

- Moondra, V., S. Sarma, et al. (2009). "Serum Neuregulin-1beta as a Biomarker of Cardiovascular Fitness." Open Biomark**J2**: 1-5.
- Morris, J. K., W. Lin, et al. (1999). "Rescue of the cardiac defect in ErbB2 mutant mice reveals essential roles of ErbB2 in peripheral nervous system development." Neuron**23**(2): 273-283.
- Mosesson, Y., G. B. Mills, et al. (2008). "Derailed endocytosis: an emerging feature of cancer." Nat Rev Cancer**8**(11): 835-850.
- Mosoni, L., E. Gattineau, et al. (2014). "High whey protein intake delayed the loss of lean body mass in healthy old rats, whereas protein type and polyphenol/antioxidant supplementation had no effects." PLoS One**9**(9): e109098.
- Moy, S. S., H. T. Ghashghaei, et al. (2009). "Deficient NRG1-ERBB signaling alters social approach: relevance to genetic mouse models of schizophrenia." J Neurodev Disord**1**(4): 302-312.
- Munafò, M. R., D. L. Thiselton, et al. (2006). "Association of the NRG1 gene and schizophrenia: a meta-analysis." Mol Psychiatry**11**(6): 539-546.
- Murray, A. J., R. E. Anderson, et al. (2004). "Uncoupling proteins in human heart." Lancet**364**(9447): 1786-1788.
- Muscogiuri, G., A. Kamat, et al. (2011). "beta-Adrenergic Responsive Induction of Insulin Resistance in Liver of Aging Rats." Endocr Res**36**(2): 74-82.
- Nadal-Ginard, B., J. Kajstura, et al. (2003). "A matter of life and death: cardiac myocyte apoptosis and regeneration." J Clin Invest**111**(10): 1457-1459.
- Naresh, A., W. Long, et al. (2006). "The ERBB4/HER4 intracellular domain 4ICD is a BH3-only protein promoting apoptosis of breast cancer cells." Cancer Res**66**(12): 6412-6420.
- Narici, M. V. and N. Maffulli (2010). "Sarcopenia: characteristics, mechanisms and functional significance." Br Med Bull**95**: 139-159.
- Nave, K. A. and J. L. Salzer (2006). "Axonal regulation of myelination by neuregulin 1." Curr Opin Neurobiol**16**(5): 492-500.
- Nederveen, J. P., S. Joannisse, et al. (2015). "The Effect of Exercise Mode on the Acute Response of Satellite Cells in Old Men." Acta Physiol (Oxf).
- Ng, N. F. and E. M. Shooter (1993). "Activation of p21ras by nerve growth factor in embryonic sensory neurons and PC12 cells." J Biol Chem**268**(34): 25329-25333.
- Ngo, S. T., R. N. Cole, et al. (2012). "Neuregulin-1 potentiates agrin-induced acetylcholine receptor clustering through muscle-specific kinase phosphorylation." J Cell Sci**125**(Pt 6): 1531-1543.
- Ni, C. Y., M. P. Murphy, et al. (2001). "gamma -Secretase cleavage and nuclear localization of ErbB-4 receptor tyrosine kinase." Science**294**(5549): 2179-2181.
- Nicolino, S., A. Panetto, et al. (2009). "Denervation and reinnervation of adult skeletal muscle modulate mRNA expression of neuregulin-1 and ErbB receptors." Microsurgery**29**(6): 464-472.
- Nishimune, H., J. A. Stanford, et al. (2014). "Role of exercise in maintaining the integrity of the neuromuscular junction." Muscle Nerve**49**(3): 315-324.
- Nogalska, A., C. D'Agostino, et al. (2012). "Activation of the gamma-secretase complex and presence of gamma-secretase-activating protein may contribute to Abeta42 production in sporadic inclusion-body myositis muscle fibers." Neurobiol Dis**48**(1): 141-149.

- Novelli, F., A. Allione, et al. (1999). "Negative cell cycle control of human T cells by beta-galactoside binding protein (beta GBP): induction of programmed cell death in leukaemic cells." J Cell Physiol**178**(1): 102-108.
- Novelli, M., V. De Tata, et al. (2000). "Age-dependent reduction in GLUT-2 levels is correlated with the impairment of the insulin secretory response in isolated islets of Sprague-Dawley rats." Exp Gerontol**35**(5): 641-651.
- O'Tuathaigh, C. M., G. J. O'Sullivan, et al. (2006). "Sexually dimorphic changes in the exploratory and habituation profiles of heterozygous neuregulin-1 knockout mice." Neuroreport**17**(1): 79-83.
- Odiete, O., M. F. Hill, et al. (2012). "Neuregulin in cardiovascular development and disease." Circ Res**111**(10): 1376-1385.
- Offterdinger, M., C. Schofer, et al. (2002). "c-erbB-3: a nuclear protein in mammary epithelial cells." J Cell Biol**157**(6): 929-939.
- Okoshi, K., M. Nakayama, et al. (2004). "Neuregulins regulate cardiac parasympathetic activity: muscarinic modulation of beta-adrenergic activity in myocytes from mice with neuregulin-1 gene deletion." Circulation**110**(6): 713-717.
- Okumura, H., N. Nagaya, et al. (2003). "Adrenomedullin infusion during ischemia/reperfusion attenuates left ventricular remodeling and myocardial fibrosis in rats." Hypertens Res**26 Suppl**: S99-104.
- Okumura, Y., I. Watanabe, et al. (2007). "Electrophysiologic and anatomical characteristics of the right atrial posterior wall in patients with and without atrial flutter: analysis by intracardiac echocardiography." Circ J**71**(5): 636-642.
- Olivetti, G., M. Melissari, et al. (1991). "Cardiomyopathy of the aging human heart. Myocyte loss and reactive cellular hypertrophy." Circ Res**68**(6): 1560-1568.
- Omerovic, J., E. M. Puggioni, et al. (2004). "Ligand-regulated association of ErbB-4 to the transcriptional co-activator YAP65 controls transcription at the nuclear level." Exp Cell Res**294**(2): 469-479.
- Omerovic, J., L. Santangelo, et al. (2007). "The E3 ligase Aip4/Itch ubiquitinates and targets ErbB-4 for degradation." FASEB J**21**(11): 2849-2862.
- Oya, J., T. Nakagami, et al. (2014). "Effects of age on insulin resistance and secretion in subjects without diabetes." Intern Med**53**(9): 941-947.
- Ozcelik, C., B. Erdmann, et al. (2002). "Conditional mutation of the ErbB2 (HER2) receptor in cardiomyocytes leads to dilated cardiomyopathy." Proc Natl Acad Sci U S A**99**(13): 8880-8885.
- Paatero, I., A. Jokilampi, et al. (2012). "Interaction with ErbB4 promotes hypoxia-inducible factor-1alpha signaling." J Biol Chem**287**(13): 9659-9671.
- Pae, M., S. N. Meydani, et al. (2012). "The role of nutrition in enhancing immunity in aging." Aging Dis**3**(1): 91-129.
- Paliwal, P., N. Pishesha, et al. (2012). "Age dependent increase in the levels of osteopontin inhibits skeletal muscle regeneration." Aging (Albany NY)**4**(8): 553-566.
- Palmio, J. and B. Udd (2014). "Borderlines between Sarcopenia and Mild Late-Onset Muscle Disease." Front Aging Neurosci**6**: 267.
- Paolisso, G., A. Scheen, et al. (1995). "Glucose handling, diabetes and ageing." Horm Res**43**(1-3): 52-57.
- Park, S. K., R. Miller, et al. (2001). "The erbB2 gene is required for the development of terminally differentiated spinal cord oligodendrocytes." J Cell Biol**154**(6): 1245-1258.

- Park, S. Y., B. Choi, et al. (2004). "Cellular aging of mitochondrial DNA-depleted cells." Biochem Biophys Res Commun**325**(4): 1399-1405.
- Park, Y. Y., S. Lee, et al. (2010). "Loss of MARCH5 mitochondrial E3 ubiquitin ligase induces cellular senescence through dynamin-related protein 1 and mitofusin 1." J Cell Sci**123**(Pt 4): 619-626.
- Parkington, J. D., N. K. LeBrasseur, et al. (2004). "Contraction-mediated mTOR, p70S6k, and ERK1/2 phosphorylation in aged skeletal muscle." J Appl Physiol (1985)**97**(1): 243-248.
- Parodi, E. M. and B. Kuhn (2014). "Signalling between microvascular endothelium and cardiomyocytes through neuregulin." Cardiovasc Res**102**(2): 194-204.
- Pedersen, B. K. and M. A. Febbraio (2012). "Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ." Nat Rev Endocrinol**8**(8): 457-465.
- Peles, E., S. S. Bacus, et al. (1992). "Isolation of the neu/HER-2 stimulatory ligand: a 44 kd glycoprotein that induces differentiation of mammary tumor cells." Cell**69**(1): 205-216.
- Peles, E. and Y. Yarden (1993). "Neu and its ligands: from an oncogene to neural factors." Bioessays**15**(12): 815-824.
- Pentassuglia, L. and D. B. Sawyer (2009). "The role of Neuregulin-1beta/ErbB signaling in the heart." Exp Cell Res**315**(4): 627-637.
- Perik, P. J., E. G. de Vries, et al. (2007). "Serum HER2 levels are increased in patients with chronic heart failure." Eur J Heart Fail**9**(2): 173-177.
- Petersen, A. M. and B. K. Pedersen (2005). "The anti-inflammatory effect of exercise." J Appl Physiol (1985)**98**(4): 1154-1162.
- Petersen, K. F., D. Befroy, et al. (2003). "Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance." Science**300**(5622): 1140-1142.
- Phaneuf, S. and C. Leeuwenburgh (2002). "Cytochrome c release from mitochondria in the aging heart: a possible mechanism for apoptosis with age." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**282**(2): R423-430.
- Phielix, E., J. Szendroedi, et al. (2011). "Mitochondrial function and insulin resistance during aging: a mini-review." Gerontology**57**(5): 387-396.
- Pickrell, J. K., G. Coop, et al. (2009). "Signals of recent positive selection in a worldwide sample of human populations." Genome Res**19**(5): 826-837.
- Polivka, J., Jr. and F. Janku (2014). "Molecular targets for cancer therapy in the PI3K/AKT/mTOR pathway." Pharmacol Ther**142**(2): 164-175.
- Polizzotti, B. D., B. Ganapathy, et al. (2015). "Neuregulin stimulation of cardiomyocyte regeneration in mice and human myocardium reveals a therapeutic window." Sci Transl Med**7**(281): 281ra245.
- Prakash, Y. S. and G. C. Sieck (1998). "Age-related remodeling of neuromuscular junctions on type-identified diaphragm fibers." Muscle Nerve**21**(7): 887-895.
- Prenzel, N., E. Zwick, et al. (1999). "EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF." Nature**402**(6764): 884-888.
- Przyklenk, K., M. Maynard, et al. (2008). "Aging mouse hearts are refractory to infarct size reduction with post-conditioning." J Am Coll Cardiol**51**(14): 1393-1398.
- Quinn, J. G., W. J. Curry, et al. (2005). "Effect of reserpine on the generation of the chromogranin A-derived neuropeptide WE-14 in rat oxyntic mucosa." Regul Pept**124**(1-3): 1-6.

- Rachmin, I., S. Tshori, et al. (2014). "Erbin is a negative modulator of cardiac hypertrophy." Proc Natl Acad Sci U S A**111**(16): 5902-5907.
- Rahier, J., Y. Guiot, et al. (2008). "Pancreatic beta-cell mass in European subjects with type 2 diabetes." Diabetes Obes Metab**10 Suppl 4**: 32-42.
- Rahnert, J. A., Q. Luo, et al. (2011). "Changes in growth-related kinases in head, neck and limb muscles with age." Exp Gerontol**46**(4): 282-291.
- Rajawat, Y. S., Z. Hilioti, et al. (2009). "Aging: central role for autophagy and the lysosomal degradative system." Ageing Res Rev**8**(3): 199-213.
- Ram, T. G., K. E. Kokeny, et al. (1995). "Mitogenic activity of neu differentiation factor/heregin mimics that of epidermal growth factor and insulin-like growth factor-I in human mammary epithelial cells." J Cell Physiol**163**(3): 589-596.
- Rasmussen, B. B., S. Fujita, et al. (2006). "Insulin resistance of muscle protein metabolism in aging." FASEB J**20**(6): 768-769.
- Ricart, K., J. J. Pearson R, et al. (2006). "Interactions between beta-neuregulin and neurotrophins in motor neuron apoptosis." J Neurochem**97**(1): 222-233.
- Ricci, C., L. Landuzzi, et al. (2000). "Expression of HER/erbB family of receptor tyrosine kinases and induction of differentiation by glial growth factor 2 in human rhabdomyosarcoma cells." Int J Cancer**87**(1): 29-36.
- Riera, C. E. and A. Dillin (2015). "Tipping the metabolic scales towards increased longevity in mammals." Nat Cell Biol**17**(3): 196-203.
- Riethmacher, D., E. Sonnenberg-Riethmacher, et al. (1997). "Severe neuropathies in mice with targeted mutations in the ErbB3 receptor." Nature**389**(6652): 725-730.
- Rimer, M., D. W. Barrett, et al. (2005). "Neuregulin-1 immunoglobulin-like domain mutant mice: clozapine sensitivity and impaired latent inhibition." Neuroreport**16**(3): 271-275.
- Rimer, M., I. Cohen, et al. (1998). "Neuregulins and erbB receptors at neuromuscular junctions and at agrin-induced postsynaptic-like apparatus in skeletal muscle." Mol Cell Neurosci**12**(1-2): 1-15.
- Rio, C., J. D. Buxbaum, et al. (2000). "Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme is required for cleavage of erbB4/HER4." J Biol Chem**275**(14): 10379-10387.
- Ritch, P. S., S. L. Carroll, et al. (2005). "Neuregulin-1 enhances survival of human astrocytic glioma cells." Glia**51**(3): 217-228.
- Roger, V. L., A. S. Go, et al. (2011). "Heart disease and stroke statistics--2011 update: a report from the American Heart Association." Circulation**123**(4): e18-e209.
- Rohrbach, S., B. Niemann, et al. (2006). "Caloric restriction and mitochondrial function in the ageing myocardium." Exp Gerontol**41**(5): 525-531.
- Rohrbach, S., X. Yan, et al. (1999). "Neuregulin in cardiac hypertrophy in rats with aortic stenosis. Differential expression of erbB2 and erbB4 receptors." Circulation**100**(4): 407-412.
- Rommel, C., S. C. Bodine, et al. (2001). "Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways." Nat Cell Biol**3**(11): 1009-1013.
- Rosenberg, I. H. (1997). "Sarcopenia: origins and clinical relevance." J Nutr**127**(5 Suppl): 990S-991S.
- Roth, S. M., G. F. Martel, et al. (2000). "Skeletal muscle satellite cell populations in healthy young and older men and women." Anat Rec**260**(4): 351-358.

- Rowe, J. W., K. L. Minaker, et al. (1983). "Characterization of the insulin resistance of aging." J Clin Invest**71**(6): 1581-1587.
- Rudin, E. and N. Barzilai (2005). "Inflammatory peptides derived from adipose tissue." Immun Ageing**2**(1): 1.
- Ruiz-Nunez, B., L. Pruijboom, et al. (2013). "Lifestyle and nutritional imbalances associated with Western diseases: causes and consequences of chronic systemic low-grade inflammation in an evolutionary context." J Nutr Biochem**24**(7): 1183-1201.
- Ryall, J. G., J. D. Schertzer, et al. (2008). "Cellular and molecular mechanisms underlying age-related skeletal muscle wasting and weakness." Biogerontology**9**(4): 213-228.
- Safa, R. N., X. Y. Peng, et al. (2011). "Neuregulin-1beta regulation of embryonic endothelial progenitor cell survival." Am J Physiol Heart Circ Physiol**300**(4): H1311-1319.
- Safdar, A., M. J. Hamadeh, et al. (2010). "Aberrant mitochondrial homeostasis in the skeletal muscle of sedentary older adults." PLoS One**5**(5): e10778.
- Sakamoto, K., M. F. Hirshman, et al. (2002). "Contraction regulation of Akt in rat skeletal muscle." J Biol Chem**277**(14): 11910-11917.
- Sanderson, M. P., P. J. Dempsey, et al. (2006). "Control of ErbB signaling through metalloprotease mediated ectodomain shedding of EGF-like factors." Growth Factors**24**(2): 121-136.
- Sandri, M., J. Lin, et al. (2006). "PGC-1alpha protects skeletal muscle from atrophy by suppressing FoxO3 action and atrophy-specific gene transcription." Proc Natl Acad Sci U S A**103**(44): 16260-16265.
- Sandrock, A. W., Jr., S. E. Dryer, et al. (1997). "Maintenance of acetylcholine receptor number by neuregulins at the neuromuscular junction in vivo." Science**276**(5312): 599-603.
- Sankaranarayanan, S., M. A. Holahan, et al. (2009). "First demonstration of cerebrospinal fluid and plasma A beta lowering with oral administration of a beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1 inhibitor in nonhuman primates." J Pharmacol Exp Ther**328**(1): 131-140.
- Sano, H., S. Kane, et al. (2003). "Insulin-stimulated phosphorylation of a Rab GTPase-activating protein regulates GLUT4 translocation." J Biol Chem**278**(17): 14599-14602.
- Sardi, S. P., J. Murtie, et al. (2006). "Presenilin-dependent ErbB4 nuclear signaling regulates the timing of astrogenesis in the developing brain." Cell**127**(1): 185-197.
- Savage, D. B., K. F. Petersen, et al. (2007). "Disordered lipid metabolism and the pathogenesis of insulin resistance." Physiol Rev**87**(2): 507-520.
- Savage, J., A. Voronova, et al. (2010). "Canonical Wnt signaling regulates Foxc1/2 expression in P19 cells." Differentiation**79**(1): 31-40.
- Savonenko, A. V., T. Melnikova, et al. (2008). "Alteration of BACE1-dependent NRG1/ErbB4 signaling and schizophrenia-like phenotypes in BACE1-null mice." Proc Natl Acad Sci U S A**105**(14): 5585-5590.
- Sawyer, D. B. and A. Caggiano (2011). "Neuregulin-1beta for the treatment of systolic heart failure." J Mol Cell Cardiol**51**(4): 501-505.
- Sawyer, D. B., C. Zuppinger, et al. (2002). "Modulation of anthracycline-induced myofibrillar disarray in rat ventricular myocytes by neuregulin-1beta and anti-erbB2: potential mechanism for trastuzumab-induced cardiotoxicity." Circulation**105**(13): 1551-1554.
- Scaltriti, M. and J. Baselga (2006). "The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy." Clin Cancer Res**12**(18): 5268-5272.

- Scarpace, P. J., Y. Shu, et al. (1994). "Influence of exercise training on myocardial beta-adrenergic signal transduction: differential regulation with age." J Appl Physiol **(1985)77(2)**: 737-741.
- Schlessinger, J. and M. A. Lemmon (2006). "Nuclear signaling by receptor tyrosine kinases: the first robin of spring." Cell**127(1)**: 45-48.
- Schulman, D. S. and R. A. Matthay (1992). "The right ventricle in pulmonary disease." Cardiol Clin**10(1)**: 111-135.
- Schulman, K. A., J. J. Escarce, et al. (1992). "Assessing physicians' estimates of the probability of coronary artery disease: the influence of patient characteristics." Med Decis Making**12(2)**: 109-114.
- Schulze, W. X., L. Deng, et al. (2005). "Phosphotyrosine interactome of the ErbB-receptor kinase family." Mol Syst Biol**1**: 2005 0008.
- Scott, G. K., R. Robles, et al. (1993). "A truncated intracellular HER2/neu receptor produced by alternative RNA processing affects growth of human carcinoma cells." Mol Cell Biol**13(4)**: 2247-2257.
- Sengupta, P. (2013). "The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's." Int J Prev Med**4(6)**: 624-630.
- Sergina, N. V. and M. M. Moasser (2007). "The HER family and cancer: emerging molecular mechanisms and therapeutic targets." Trends Mol Med**13(12)**: 527-534.
- Shefer, G., D. P. Van de Mark, et al. (2006). "Satellite-cell pool size does matter: defining the myogenic potency of aging skeletal muscle." Dev Biol**294(1)**: 50-66.
- Shinohara, M. (2011). "Adaptations in motor unit behavior in elderly adults." Curr Aging Sci**4(3)**: 200-208.
- Shirakabe, K., S. Wakatsuki, et al. (2001). "Roles of Meltrin beta /ADAM19 in the processing of neuregulin." J Biol Chem**276(12)**: 9352-9358.
- Short, K. R., M. L. Bigelow, et al. (2005). "Decline in skeletal muscle mitochondrial function with aging in humans." Proc Natl Acad Sci U S A**102(15)**: 5618-5623.
- Short, K. R., J. L. Vittone, et al. (2004). "Age and aerobic exercise training effects on whole body and muscle protein metabolism." Am J Physiol Endocrinol Metab**286(1)**: E92-101.
- Sibilia, M., J. P. Steinbach, et al. (1998). "A strain-independent postnatal neurodegeneration in mice lacking the EGF receptor." EMBO J**17(3)**: 719-731.
- Sibilia, M. and E. F. Wagner (1995). "Strain-dependent epithelial defects in mice lacking the EGF receptor." Science**269(5221)**: 234-238.
- Sierke, S. L., K. Cheng, et al. (1997). "Biochemical characterization of the protein tyrosine kinase homology domain of the ErbB3 (HER3) receptor protein." Biochem J**322 ( Pt 3)**: 757-763.
- Singh, B. K. and D. D. Mascarenhas (2008). "Bioactive peptides control receptor for advanced glycated end product-induced elevation of kidney insulin receptor substrate 2 and reduce albuminuria in diabetic mice." Am J Nephrol**28(6)**: 890-899.
- Slamon, D. J., G. M. Clark, et al. (1987). "Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene." Science**235(4785)**: 177-182.
- Slamon, D. J., B. Leyland-Jones, et al. (2001). "Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2." N Engl J Med**344(11)**: 783-792.
- Slawik, M. and A. J. Vidal-Puig (2006). "Lipotoxicity, overnutrition and energy metabolism in aging." Ageing Res Rev**5(2)**: 144-164.

- Song, F., P. Chiang, et al. (2012). "Aberrant neuregulin 1 signaling in amyotrophic lateral sclerosis." J Neuropathol Exp Neurol**71**(2): 104-115.
- Soriguer, F., N. Colomo, et al. (2014). "Modifications of the homeostasis model assessment of insulin resistance index with age." Acta Diabetol**51**(6): 917-925.
- Sorkin, A. and L. K. Goh (2009). "Endocytosis and intracellular trafficking of ErbBs." Exp Cell Res**315**(4): 683-696.
- Sousa-Victor, P., S. Gutarra, et al. (2014). "Geriatric muscle stem cells switch reversible quiescence into senescence." Nature**506**(7488): 316-321.
- Srikanthan, P., A. L. Hevener, et al. (2010). "Sarcopenia exacerbates obesity-associated insulin resistance and dysglycemia: findings from the National Health and Nutrition Examination Survey III." PLoS One**5**(5): e10805.
- Stefansson, H., E. Sigurdsson, et al. (2002). "Neuregulin 1 and susceptibility to schizophrenia." Am J Hum Genet**71**(4): 877-892.
- Stitt, T. N., D. Drujan, et al. (2004). "The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors." Mol Cell**14**(3): 395-403.
- Suarez, E., D. Bach, et al. (2001). "A novel role of neuregulin in skeletal muscle. Neuregulin stimulates glucose uptake, glucose transporter translocation, and transporter expression in muscle cells." J Biol Chem**276**(21): 18257-18264.
- Supale, S., N. Li, et al. (2012). "Mitochondrial dysfunction in pancreatic beta cells." Trends Endocrinol Metab**23**(9): 477-487.
- Supale, S., F. Thorel, et al. (2013). "Loss of prohibitin induces mitochondrial damages altering beta-cell function and survival and is responsible for gradual diabetes development." Diabetes**62**(10): 3488-3499.
- Suzuki, Y., H. Miura, et al. (2002). "Targeted disruption of LIG-1 gene results in psoriasiform epidermal hyperplasia." FEBS Lett**521**(1-3): 67-71.
- Swindell, W. R. (2009). "Genes and gene expression modules associated with caloric restriction and aging in the laboratory mouse." BMC Genomics**10**: 585.
- Sysa-Shah, P., Y. Xu, et al. (2012). "Cardiac-specific over-expression of epidermal growth factor receptor 2 (ErbB2) induces pro-survival pathways and hypertrophic cardiomyopathy in mice." PLoS One**7**(8): e42805.
- Szendroedi, J., E. Phielix, et al. (2012). "The role of mitochondria in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus." Nat Rev Endocrinol**8**(2): 92-103.
- Taicher, G. Z., F. C. Tinsley, et al. (2003). "Quantitative magnetic resonance (QMR) method for bone and whole-body-composition analysis." Anal Bioanal Chem**377**(6): 990-1002.
- Tamura, H., M. Kawata, et al. (2012). "Processing of neuregulin-1 by neuropsin regulates GABAergic neuron to control neural plasticity of the mouse hippocampus." J Neurosci**32**(37): 12657-12672.
- Tamura, Y., N. Izumiyama-Shimomura, et al. (2014). "beta-cell telomere attrition in diabetes: inverse correlation between HbA1c and telomere length." J Clin Endocrinol Metab**99**(8): 2771-2777.
- Tapinos, N., M. Ohnishi, et al. (2006). "ErbB2 receptor tyrosine kinase signaling mediates early demyelination induced by leprosy bacilli." Nat Med**12**(8): 961-966.
- Thomson, D. M. and S. E. Gordon (2006). "Impaired overload-induced muscle growth is associated with diminished translational signalling in aged rat fast-twitch skeletal muscle." J Physiol**574**(Pt 1): 291-305.

- Thornell, L. E., M. Lindstrom, et al. (2003). "Satellite cells and training in the elderly." Scand J Med Sci Sports**13**(1): 48-55.
- Threadgill, D. W., A. A. Dlugosz, et al. (1995). "Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype." Science**269**(5221): 230-234.
- Tidcombe, H., A. Jackson-Fisher, et al. (2003). "Neural and mammary gland defects in ErbB4 knockout mice genetically rescued from embryonic lethality." Proc Natl Acad Sci U S A**100**(14): 8281-8286.
- Toledo, F. G. and B. H. Goodpaster (2013). "The role of weight loss and exercise in correcting skeletal muscle mitochondrial abnormalities in obesity, diabetes and aging." Mol Cell Endocrinol**379**(1-2): 30-34.
- Trinidad, J. C., G. D. Fischbach, et al. (2000). "The Agrin/MuSK signaling pathway is spatially segregated from the neuregulin/ErbB receptor signaling pathway at the neuromuscular junction." J Neurosci**20**(23): 8762-8770.
- Tsai, P. W., S. G. Shiah, et al. (2003). "Up-regulation of vascular endothelial growth factor C in breast cancer cells by heregulin-beta 1. A critical role of p38/nuclear factor-kappa B signaling pathway." J Biol Chem**278**(8): 5750-5759.
- Tschudi, M. R., M. Barton, et al. (1996). "Effect of age on kinetics of nitric oxide release in rat aorta and pulmonary artery." J Clin Invest**98**(4): 899-905.
- Veikkolainen, V., K. Vaparanta, et al. (2011). "Function of ERBB4 is determined by alternative splicing." Cell Cycle**10**(16): 2647-2657.
- Ventura-Clapier, R., A. Garnier, et al. (2008). "Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1alpha." Cardiovasc Res**79**(2): 208-217.
- Verdijk, L. B., T. Snijders, et al. (2014). "Satellite cells in human skeletal muscle; from birth to old age." Age (Dordr)**36**(2): 545-547.
- Vina, J., M. C. Gomez-Cabrera, et al. (2009). "Mitochondrial biogenesis in exercise and in ageing." Adv Drug Deliv Rev**61**(14): 1369-1374.
- Vinay, L., F. Brocard, et al. (2000). "Perinatal development of lumbar motoneurons and their inputs in the rat." Brain Res Bull**53**(5): 635-647.
- Volpi, E. and B. B. Rasmussen (2000). "Nutrition and muscle protein metabolism in the elderly." Diabetes Nutr Metab**13**(2): 99-107.
- Volpi, E., M. Sheffield-Moore, et al. (2001). "Basal muscle amino acid kinetics and protein synthesis in healthy young and older men." JAMA**286**(10): 1206-1212.
- Wali, V. B., M. Gilmore-Hebert, et al. (2014). "Overexpression of ERBB4 JM-a CYT-1 and CYT-2 isoforms in transgenic mice reveals isoform-specific roles in mammary gland development and carcinogenesis." Breast Cancer Res**16**(6): 501.
- Wang, J. Y., S. J. Miller, et al. (2001). "The N-terminal region of neuregulin isoforms determines the accumulation of cell surface and released neuregulin ectodomain." J Biol Chem**276**(4): 2841-2851.
- Wang, S. C., H. C. Lien, et al. (2004). "Binding at and transactivation of the COX-2 promoter by nuclear tyrosine kinase receptor ErbB-2." Cancer Cell**6**(3): 251-261.
- Wang, Y. N., H. Yamaguchi, et al. (2010). "Nuclear trafficking of the epidermal growth factor receptor family membrane proteins." Oncogene**29**(28): 3997-4006.
- Watson, R. T. and J. E. Pessin (2006). "Bridging the GAP between insulin signaling and GLUT4 translocation." Trends Biochem Sci**31**(4): 215-222.
- Welle, S., A. I. Brooks, et al. (2003). "Gene expression profile of aging in human muscle." Physiol Genomics**14**(2): 149-159.

- Welle, S., C. Thornton, et al. (1995). "Myofibrillar protein synthesis in young and old human subjects after three months of resistance training." Am J Physiol**268**(3 Pt 1): E422-427.
- Wen, D., E. Peles, et al. (1992). "Neu differentiation factor: a transmembrane glycoprotein containing an EGF domain and an immunoglobulin homology unit." Cell**69**(3): 559-572.
- Wen, D., S. V. Suggs, et al. (1994). "Structural and functional aspects of the multiplicity of Neu differentiation factors." Mol Cell Biol**14**(3): 1909-1919.
- Wens, I., U. Dalgas, et al. (2014). "Multiple sclerosis affects skeletal muscle characteristics." PLoS One**9**(9): e108158.
- White, M., R. Roden, et al. (1994). "Age-related changes in beta-adrenergic neuroeffector systems in the human heart." Circulation**90**(3): 1225-1238.
- Whiteman, E. L., H. Cho, et al. (2002). "Role of Akt/protein kinase B in metabolism." Trends Endocrinol Metab**13**(10): 444-451.
- Wieduwilt, M. J. and M. M. Moasser (2008). "The epidermal growth factor receptor family: biology driving targeted therapeutics." Cell Mol Life Sci**65**(10): 1566-1584.
- Wilkes, E. A., A. L. Selby, et al. (2009). "Blunting of insulin inhibition of proteolysis in legs of older subjects may contribute to age-related sarcopenia." Am J Clin Nutr**90**(5): 1343-1350.
- Willem, M., A. N. Garratt, et al. (2006). "Control of peripheral nerve myelination by the beta-secretase BACE1." Science**314**(5799): 664-666.
- Williams, C. C., J. G. Allison, et al. (2004). "The ERBB4/HER4 receptor tyrosine kinase regulates gene expression by functioning as a STAT5A nuclear chaperone." J Cell Biol**167**(3): 469-478.
- Wisniewska, M., P. Goettig, et al. (2008). "Structural determinants of the ADAM inhibition by TIMP-3: crystal structure of the TACE-N-TIMP-3 complex." J Mol Biol**381**(5): 1307-1319.
- Woldeyesus, M. T., S. Britsch, et al. (1999). "Peripheral nervous system defects in erbB2 mutants following genetic rescue of heart development." Genes Dev**13**(19): 2538-2548.
- Wolpowitz, D., T. B. Mason, et al. (2000). "Cysteine-rich domain isoforms of the neuregulin-1 gene are required for maintenance of peripheral synapses." Neuron**25**(1): 79-91.
- Wong, J. and C. S. Weickert (2009). "Transcriptional interaction of an estrogen receptor splice variant and ErbB4 suggests convergence in gene susceptibility pathways in schizophrenia." J Biol Chem**284**(28): 18824-18832.
- Wright, D. C., K. A. Hucker, et al. (2004). "Ca<sup>2+</sup> and AMPK both mediate stimulation of glucose transport by muscle contractions." Diabetes**53**(2): 330-335.
- Wu, Z., P. Puigserver, et al. (1999). "Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1." Cell**98**(1): 115-124.
- Xiao, R. P., E. D. Tomhave, et al. (1998). "Age-associated reductions in cardiac beta1- and beta2-adrenergic responses without changes in inhibitory G proteins or receptor kinases." J Clin Invest**101**(6): 1273-1282.
- Xie, Y., Y. Chen, et al. (2013). "Potent CD4<sup>+</sup> T-cell epitope P30 enhances HER2/neu-engineered dendritic cell-induced immunity against Tg1-1 breast cancer in transgenic FVBneuN mice by enhanced CD4<sup>+</sup> T-cell-stimulated CTL responses." Cancer Gene Ther**20**(10): 590-598.

- Xie, Y. and M. C. Hung (1994). "Nuclear localization of p185neu tyrosine kinase and its association with transcriptional transactivation." Biochem Biophys Res Commun**203**(3): 1589-1598.
- Xu, C., L. Lv, et al. (2012). "Neuregulin1beta1 protects oligodendrocyte progenitor cells from oxygen glucose deprivation injury induced apoptosis via ErbB4-dependent activation of PI3-kinase/Akt." Brain Res**1467**: 104-112.
- Xu, G., T. Watanabe, et al. (2009). "Preventive effects of heregulin-beta1 on macrophage foam cell formation and atherosclerosis." Circ Res**105**(5): 500-510.
- Xu, Z., J. Jiang, et al. (2004). "Neuregulin-1 is neuroprotective and attenuates inflammatory responses induced by ischemic stroke." Biochem Biophys Res Commun**322**(2): 440-446.
- Yamauchi, T., K. Ueki, et al. (1997). "Tyrosine phosphorylation of the EGF receptor by the kinase Jak2 is induced by growth hormone." Nature**390**(6655): 91-96.
- Yamauchi, T., N. Yamauchi, et al. (2000). "Constitutive tyrosine phosphorylation of ErbB-2 via Jak2 by autocrine secretion of prolactin in human breast cancer." J Biol Chem**275**(43): 33937-33944.
- Yamaza, H., T. Chiba, et al. (2002). "Lifespan extension by caloric restriction: an aspect of energy metabolism." Microsc Res Tech**59**(4): 325-330.
- Yang, X., S. Arber, et al. (2001). "Patterning of muscle acetylcholine receptor gene expression in the absence of motor innervation." Neuron**30**(2): 399-410.
- Yarden, Y. (2001). "Biology of HER2 and its importance in breast cancer." Oncology**61 Suppl 2**: 1-13.
- Yin, D. M., Y. J. Chen, et al. (2013). "Reversal of behavioral deficits and synaptic dysfunction in mice overexpressing neuregulin 1." Neuron**78**(4): 644-657.
- Yokoyama, K., T. Yamada, et al. (2015). "Relationship between hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysregulation and insulin resistance in elderly patients with depression." Psychiatry Res**226**(2-3): 494-498.
- Yutzey, K. E. (2015). "Regenerative biology: Neuregulin 1 makes heart muscle." Nature**520**(7548): 445-446.
- Zhang, X. M., Y. Cai, et al. (2009). "Beta-secretase-1 elevation in transgenic mouse models of Alzheimer's disease is associated with synaptic/axonal pathology and amyloidogenesis: implications for neuritic plaque development." Eur J Neurosci**30**(12): 2271-2283.
- Zhao, J., Y. Fu, et al. (2007). "Beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 levels become elevated in neurons around amyloid plaques: implications for Alzheimer's disease pathogenesis." J Neurosci**27**(14): 3639-3649.
- Zhao, Y. Y., O. Feron, et al. (1999). "Neuregulin signaling in the heart. Dynamic targeting of erbB4 to caveolar microdomains in cardiac myocytes." Circ Res**84**(12): 1380-1387.
- Zhao, Y. Y., D. R. Sawyer, et al. (1998). "Neuregulins promote survival and growth of cardiac myocytes. Persistence of ErbB2 and ErbB4 expression in neonatal and adult ventricular myocytes." J Biol Chem**273**(17): 10261-10269.

---

# ANNEXES

## **PUBLICATIONS EN RAPPORT DIRECT AVEC LE TRAVAIL DOCTORAL**

### **Neuregulin 1 improves glucose tolerance in adult and old rats.\***

Caillaud K, Boisseau N, Ennequin G, Chavanelle V, Etienne M, Li X, Denis P, Dardevet D, Lacampagne A, Sirvent P. *Diabetes Metab.* 2015

### **Effet du vieillissement sur le clivage d'ErbB4 induit par la contraction musculaire.**

Caillaud K, Boisseau N, Ennequin G, Chavanelle V, Etienne M, Martin V, Lacampagne A, Sirvent P. *En cours de rédaction*

### **Effet du vieillissement sur la réponse cellulaire cardiaque à la NRG1.**

Caillaud K, Boisseau N, Ennequin G, Chavanelle V, Etienne M, Li X, Denis P, Lacampagne A, Sirvent P. *En cours de rédaction*

## **PUBLICATIONS EN RAPPORT AVEC LA NEUREGULIN**

### **Exercise training and return to a well-balanced diet activate the neuregulin 1/ErbB pathway in skeletal muscle of obese rats.\***

Ennequin G, Boisseau N, Caillaud K, Chavanelle V, Gerbaix M, Metz L, Etienne M, Walrand S, Masgrau A, Guillet C, Courteix D, Niu A, Li YP, Capel F, Sirvent P. *J Physiol.* 2015

### **Neuregulin 1 affects leptin levels, food intake and weight gain in normal-weight, but not obese, db/db mice.\***

Ennequin G, Boisseau N, Caillaud K, Chavanelle V, Etienne M, Li X, Montaurier C, Sirvent P. *Diabetes Metab.* 2015

### **Neuréguline 1 Improves Glucose Tolerance in db/db Mice.\***

Ennequin G, Boisseau N, Caillaud K, Chavanelle V, Etienne M, Li X, Sirvent P. *PLoS One.* 2015

## **PUBLICATIONS ANNEXE AU TRAVAIL AU SEIN DU LABORATOIRE**

### **Comparison of oxygen consumption in rats during uphill (concentric) and downhill (eccentric) treadmill exercise tests.\***

Chavanelle V, Sirvent P, Ennequin G, Caillaud K, Montaurier C, Morio B, Boisseau N, Richard R. *J Sports Sci Med.* 2014

*\* Publications placées en annexes*