



**HAL**  
open science

# Impact des modalités d'un exercice physique sur la neuroplasticité. Focus sur les sources de BDNF

Marina Cefis

## ► To cite this version:

Marina Cefis. Impact des modalités d'un exercice physique sur la neuroplasticité. Focus sur les sources de BDNF. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Bourgogne Franche-Comté, 2019. Français. NNT : 2019UBFCK049 . tel-02402708

**HAL Id: tel-02402708**

**<https://theses.hal.science/tel-02402708>**

Submitted on 10 Dec 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.



**THESE DE DOCTORAT DE L'ETABLISSEMENT UNIVERSITE BOURGOGNE  
FRANCHE-COMTE**

UFR des sciences de santé - Laboratoire INSERM U1093 - Cognition, Action et  
Plasticité Sensorimotrice

École doctorale « Environnements - Santé » n° 554

En vue de l'obtention du grade de Docteur d'Université

Spécialités : Biochimie, Biologie moléculaire et Neurosciences

**Impact des modalités d'un exercice physique sur  
la neuroplasticité. Focus sur les sources de BDNF**

Par Marina CEFIS

Présentée et soutenue publiquement à Dijon, le 8 novembre 2019

Composition du Jury :

M<sup>me</sup> Canu Marie-Hélène, Professeur de Neurosciences, Université de Lille  
M<sup>r</sup> Py Guillaume, Maître de conférences, Université de Montpellier  
M<sup>me</sup> Bertrand Nathalie, Professeur de Pharmacologie, Université de Bourgogne  
M<sup>r</sup> Laurin Jérôme, Maître de conférences, Université d'Aix/Marseille  
M<sup>me</sup> Prigent-Tessier Anne, Professeur de Physiologie, Université de Bourgogne  
M<sup>r</sup> Garnier Philippe, Maître de conférences, Université de Bourgogne

Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur, Président  
Examineur  
Codirecteur de thèse  
Directeur de thèse

Avant-propos

A ma maman,

## Remerciements

*Je tiens à adresser mes sincères remerciements aux membres du jury*

*A Madame Marie Hélène Canu, Professeur de neurosciences à la faculté des sciences de Lille 1, et à Monsieur Guillaume Py, Maître de conférences à la faculté des sciences du sport de Montpellier,*

Merci de me faire l'honneur d'expertiser ce travail de thèse en tant que rapporteurs. Veuillez trouver ici le témoignage de mon profond respect.

*A Madame Nathalie Bertrand, Professeur de pharmacologie à l'I.U.T. Génie biologique de Dijon, et à Monsieur Jérôme Laurin, Maître de conférences à la faculté des sciences du sport d'Aix – Marseille,*

Merci d'avoir accepté de juger ce travail en tant qu'examineurs. Veuillez trouver ici le témoignage de ma gratitude.

*A Madame Anne Prigent-Tessier, Professeur de Physiologie à l'UFR des sciences de santé de Dijon, co-directrice de ce travail de thèse,*

Merci pour votre optimisme à toute épreuve, votre disponibilité, vos conseils, votre soutien et la confiance que vous m'avez accordée durant ces trois années de thèse. J'ai beaucoup appris à vos côtés.

*A Monsieur Philippe Garnier, Maître de conférences à l'I.U.T. Génie biologique de Dijon, directeur de ce travail de thèse,*

Merci de m'avoir accueillie et supervisée depuis maintenant 4 ans. Merci pour la confiance que tu m'as accordée tant à l'IUT que pour la thèse. Merci également pour ta disponibilité, tes conseils et ton soutien.

**Mais aussi,**

*A Christine Marie, Professeur à l'UFR des Sciences de Santé de Dijon,*

Merci de m'avoir accueillie au sein de votre équipe depuis le Master 2. Merci pour vos conseils avisés, tant sur le plan pratique que rédactionnel.

*A Aurore Quirié, Ingénieur d'étude de l'équipe,*

Merci de m'avoir formée aux techniques du laboratoire et de m'avoir transmis ta rigueur dans l'élaboration de mon travail et dans l'analyse de mes données. Merci d'avoir été présente en tant que collègue mais également en tant qu'amie pour me soutenir tant sur le plan professionnel que personnel. Merci pour ces bons moments passés ensemble au laboratoire et en dehors, en espérant que cela continue.

*A Martin Pedard, Nicolas Pernet, Alexandre Meloux, Jeanne Merignac-Lacombe, Rémy Chaney,*

Merci pour tous ces moments passés ensemble, pour le soutien professionnel et personnel que vous m'avez apportée durant ces trois ans. Merci d'avoir su me donner le sourire lors des moments les plus compliqués de la thèse. Je vous souhaite à tous une bonne continuation à l'U1093 ou ailleurs...

*A mes amis de longue date, du lycée, du handball, de Montpellier (Ben, Pierro, Floriane, Florine, Pepern, Anaïs, Jules, Mylena, Hélène, Machou, Monmouss, Matou, Manon, Geogeo, Chamo, et bien d'autres encore)*

Merci pour ces super moments passés à vos côtés, depuis maintenant plus de 10 ans pour certains. Merci pour toutes les soirées arrosées, pour les week-end entre meufs, pour les brunchs du dimanche, pour les bons moments passés sur un terrain de hand ou dans un amphithéâtre à la fac des sciences. Merci à vous de m'avoir soutenue durant la thèse à votre manière.

*A ma mère et mon frère,*

Merci Mamoune pour ton soutien irréprochable durant toutes ces années d'études à Dijon et à Montpellier. Merci pour ton écoute attentive lors des moments de joie et les moments difficiles que j'ai pu rencontrer. Je te dédis ce manuscrit.

Mon Benou, merci de m'avoir soutenue durant toutes ces années d'études et de croire en moi. J'espère que vous serez fiers de moi.

*A Sylvain,*

Mon amour, mon meilleur ami, mon Deutchi. Merci de m'avoir soutenue durant les bons et les mauvais moments de la thèse. Merci d'être resté toujours positif et de m'avoir poussé à garder le moral jusqu'à la fin. Enfin, merci de faire de moi la femme que je suis aujourd'hui. La vie est tellement plus belle à tes cotés.

## Table des matières

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Remerciements</b>   | <b>2</b>  |
| <b>Table des matières</b>  | <b>5</b>  |
| <b>Liste des illustrations et tableaux</b>                                 | <b>8</b>  |
| <b>Liste des abréviations</b>  | <b>9</b>  |
| <b>Résumé</b>  | <b>11</b> |
| <b>Abstract</b>  | <b>12</b> |
| <b>Introduction générale</b>   | <b>13</b> |
| <b>Partie 1 – Etat de l’art</b>  | <b>16</b> |
| <b>A. L’Exercice Physique</b>  | <b>17</b> |
| 1. Données générales   | 17        |
| 2. Exercice physique et santé cérébrale                                    | 18        |
| a. Amélioration des fonctions cognitives                                   | 18        |
| b. Amélioration du bien-être psychique                                     | 21        |
| 3. Modifications cellulaires en réponse à l’EX                             | 23        |
| a. Neurogenèse   | 24        |
| b. Synaptogenèse   | 26        |
| c. Angiogenèse   | 27        |
| d. La potentialisation à long terme  | 28        |
| 4. Les tests comportementaux   | 31        |
| a. Le test de la piscine de Morris (Morris water maze test)                | 31        |
| b. Le test du labyrinthe de Barnes (Barnes maze test)                      | 32        |
| c. Le test de reconnaissance d’objet (Novel object recognition test, NORT) | 33        |
| d. Le test du labyrinthe à bras radial (Radial arm maze test)              | 35        |
| <b>B. Le Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)</b>                      | <b>37</b> |
| 1. Description générale  | 37        |
| 2. Métabolisme   | 37        |
| a. Les transcrits BDNF   | 39        |
| b. Le polymorphisme Val66Met   | 40        |
| c. Régulation de l’expression du BDNF                                      | 40        |
| 3. Mécanismes d’action   | 41        |
| a. Les Récepteurs TrkB et voies de signalisation intracellulaire           | 41        |
| b. Localisation des isoformes TrkB   | 44        |
| 4. Localisation tissulaire   | 44        |
| a. Localisation cérébrale  | 44        |
| b. Localisation périphérique   | 45        |
| 5. Les sources cellulaires de BDNF   | 46        |
| a. Le cerveau  | 46        |
| b. L’endothélium   | 50        |
| c. Le muscle   | 54        |
| <b>C. Exercice physique et BDNF</b>  | <b>61</b> |
| 1. Le BDNF : médiateur des effets bénéfiques de l’EX                       | 61        |
| 2. Impact des modalités de l’EX sur le BDNF et la neuroplasticité          | 62        |
| a. Durée   | 62        |
| b. Fréquence   | 63        |
| c. Intensité   | 64        |

|                   |  |           |
|-------------------|--|-----------|
| d.                | Contractions musculaires _____   | 66        |
| 3.                | Lien entre EX et augmentation de la production cérébrale de BDNF _____   | 67        |
| a.                | L'activité neuronale _____   | 67        |
| b.                | Le flux sanguin cérébral _____   | 68        |
| c.                | Les myokines _____   | 69        |
| d.                | Les cytokines _____  | 72        |
| e.                | Les métabolites _____  | 74        |
| f.                | Modulateurs épigénétiques _____  | 75        |
| <b>Partie 2 –</b> | <b>Présentation des travaux _____</b>  | <b>79</b> |
| <b>A.</b>         | <b>Matériels et méthodes _____</b>   | <b>80</b> |
| 1.                | Mesure de la vitesse maximale aérobie _____  | 80        |
| 2.                | Protocole d'EX _____   | 81        |
| a.                | Étude de l'intensité de l'EX _____   | 81        |
| b.                | Étude des contractions musculaires _____   | 82        |
| 3.                | Tests comportementaux _____  | 82        |
| a.                | Test de reconnaissance d'objet _____   | 82        |
| b.                | Test d'enfouissement des billes _____  | 84        |
| c.                | Test de locomotion _____   | 86        |
| <b>B.</b>         | <b>Publications scientifiques _____</b>  | <b>87</b> |
| I.                | Étude 1 : Première publication – Réponse uniforme du Brain-derived neurotrophic factor d'origine artériel et veineux à un exercice sur tapis roulant chez le rat mâle __ | 87        |
| a.                | Contexte _____   | 88        |
| b.                | Objectifs _____  | 88        |
| c.                | Protocole expérimental _____   | 88        |
| d.                | Principaux résultats _____   | 88        |
| II.               | Étude 2 : Deuxième publication – L'effet de l'exercice sur la mémoire et la voie de signalisation du BDNF dépend de l'intensité _____                                    | 113       |
| a.                | Contexte _____   | 114       |
| b.                | Objectifs _____  | 114       |
| c.                | Protocole expérimental _____   | 114       |
| d.                | Principaux résultats _____   | 114       |
| III.              | Étude 3 : Troisième publication : Étude de la voie de signalisation du BDNF après un exercice concentrique et excentrique chez le rat _____                              | 128       |
| a.                | Contexte _____   | 129       |
| b.                | Objectifs _____  | 129       |
| c.                | Protocole expérimental _____   | 129       |
| d.                | Principaux résultats _____   | 129       |
| IV.               | Étude 4 : Expression et caractérisation du BDNF dans le muscle squelettique _  | 139       |
| 1.                | Impact de l'intensité de l'EX sur les expressions de BDNF et FNDC5 dans le muscle squelettique _____   | 139       |
| a.                | Contexte de l'expérience _____   | 139       |
| b.                | Objectifs _____  | 139       |
| c.                | Protocole expérimental _____   | 139       |
| d.                | Résultats _____  | 140       |
| e.                | Discussion _____   | 144       |
| 2.                | Caractérisation de l'expression cellulaire du BDNF dans le muscle squelettique<br>146  |           |
| a.                | Contexte de l'expérience _____   | 146       |
| b.                | Objectifs _____  | 146       |
| c.                | Matériels et méthodes _____  | 146       |
| d.                | Résultats _____  | 147       |

|   |            |
|---|------------|
| e. Discussion   | 149        |
| <b>Partie 3 – Discussion générale et perspectives</b> | <b>150</b> |
| 1. Etude 1 – Le BDNF d’origine vasculaire             | 151        |
| 2. Etudes 2 et 3 - Impact des modalités de l’EX       | 153        |
| a. Considération méthodologique du protocole d’EX     | 153        |
| b. Impact des modalités de l’EX sur le BDNF cérébral  | 154        |
| c. BDNF d’origine cérébral                            | 155        |
| d. Effet de l’intensité de l’EX sur la mémoire        | 155        |
| e. Retombées cliniques                                | 156        |
| 3. Etude 4 - Le BDNF musculaire                       | 157        |
| <b>Publications et communications</b>                 | <b>159</b> |
| <b>Références bibliographiques</b>                    | <b>161</b> |

## Liste des illustrations et tableaux

|   |     |
|---|-----|
| Figure 1 : Représentation des effets positifs de l'EX sur la cognition et la santé mentale. ....  | 23  |
| Figure 2 : Représentation schématique de la potentialisation à long terme (LTP). ....   | 29  |
| Figure 3 : Effet de l'EX sur la LTP dans le GD de l'hippocampe. ....  | 30  |
| Figure 4 : Effet de l'EX sur la mémoire spatiale évaluée par le test de la piscine de Morris. ....  | 32  |
| Figure 5 : Effet de différents types d'EX sur le temps de fuite de l'animal évalué par le test du labyrinthe de Barnes. ....  | 33  |
| Figure 6 : Effet d'un EX imposé sur la mémoire de reconnaissance chez le rat évaluée par le test de reconnaissance d'objet. ....  | 34  |
| Figure 7 : Impact d'un EX volontaire chez le rat sur la mémoire de reconnaissance. ....   | 35  |
| Figure 8 : Effet d'un EX imposé sur la mémoire spatiale évaluée par le labyrinthe à bras radial. ....   | 36  |
| Figure 9 : Schéma des séquences des différents domaines constituant la protéine BDNF. ....  | 38  |
| Figure 10 : Métabolisme du BDNF neuronal et mécanismes impliqués dans le clivage du proBDNF en BDNF. ....   | 38  |
| Figure 11 : Représentation des transcrits bdnf selon les nomenclatures de Timmusk et Aid. ....  | 39  |
| Figure 12 : Structure du récepteur TrkB. ....   | 42  |
| Figure 13 : Voies de signalisation induites par la fixation du BDNF sur le récepteur TrkB-FL. D'après Fenner (2012). ....   | 43  |
| Figure 14 : Représentation de l'unité neuroglivovasculaire. ....  | 48  |
| Figure 15 : Représentation des effets neuroplastiques du BDNF d'origine endothélial. ....   | 54  |
| Figure 16 : Composition cellulaire du muscle squelettique. ....   | 55  |
| Figure 17 : Schéma illustrant l'implication de l'irisine et la cathepsine B dans les effets positifs de l'EX sur le cerveau. D'après la revue de Pedersen BK et al., 2019. .... | 71  |
| Figure 18 : Représentation de l'implication du $\beta$ -HB et du lactate, dans la synthèse et expression du BDNF dans l'hippocampe après l'EX. ....                             | 75  |
| Figure 19 : Modulation de l'expression du gène bdnf par les facteurs épigénétiques. ....  | 77  |
| Figure 20 : Représentation du lien entre EX et augmentation de la production cérébrale de BDNF. ....  | 78  |
| Figure 21 : Représentation du test de reconnaissance d'objet. ....  | 83  |
| Figure 22 : Test d'enfouissement des billes après passage de l'animal. ....   | 85  |
| Figure 23 : Impact du traitement à la scopolamine et de l'EX sur la locomotion (A) et l'enfouissement des billes (B). ....  | 127 |
| Figure 24 : Caractérisation de l'expression musculaire du BDNF dans les muscles soléaire et gastrocnémien par ELISA. ....   | 142 |
| Figure 25 : Effet de l'intensité de l'EX sur l'expression protéique de FNDC5 dans le muscle soléaire. ....  | 142 |
| Figure 26 : Corrélations entre les expressions protéiques de BDNF cérébral (hippocampe) et FNDC5 musculaire (muscle soléaire) pour les groupes EX12 et EX18. ....               | 143 |
| Figure 27: Représentation des co-marquages BDNF / fibres lentes (MyHC I) et BDNF / fibres rapides (MyHC II) dans le muscle soléaire. ....                                       | 148 |
| Figure 28 : Représentation des co-marquages BDNF / fibres lentes (MyHC I) et BDNF / fibres rapides (MyHC II) dans le muscle gastrocnémien. ....                                 | 148 |
| Tableau 1 : Caractéristiques des fibres musculaires extrafusales. ....  | 56  |
| Tableau 2 : Liste des anticorps primaires et secondaires utilisés pour la technique de WB. ....   | 140 |
| Tableau 3 : Comparaison des taux protéiques de BDNF et FNDC5 entre les muscles soléaires et gastrocnémiens par analyse de WB. ....  | 143 |
| Tableau 4 : Liste des anticorps primaires et secondaires utilisés lors de la technique d'immunofluorescence. ....   | 147 |

## Liste des abréviations

|        |  |
|--------|--|
| Aβ     | Amyloïde β   |
| AβO    | Oligomère Aβ   |
| ADN    | Acide désoxyribonucléique  |
| AMPA   | Acide propionique alpha-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole           |
| AP     | Activité physique  |
| ARNm   | Acide ribonucléique messenger  |
| AVC    | Accident Vasculaire Cérébral   |
| BDNF   | Brain derived-neurotrophic factor                                      |
| β -HB  | β-hydroxybutyrate  |
| BHE    | Barrière hémato-encéphalique   |
| CE     | Cellule endothéliale   |
| CEC    | Cellule endothéliale cérébrale   |
| CHAPS  | 3-[(3-cholamidopropyl) diméthylammonio]-1-propane sulfonate            |
| CMLV   | Cellule musculaire lisse vasculaire                                    |
| CREB   | cAMP response element-binding protein                                  |
| CTSB   | Cathepsine B   |
| DAPI   | 4',6-diamidino-2-phénylindole  |
| DCX    | Doublecortine  |
| DNMT   | DNA méthyltransférase  |
| DV     | Démence vasculaire   |
| ELISA  | Enzyme-Linked Immuno Assay (Dosage d'immunoabsorption par enzyme liée) |
| eNOS   | Endothelial nitric oxide synthase                                      |
| EX     | Exercice physique  |
| EX12   | Exercés à 12 m/min   |
| EX18   | Exercés à 18 m/min   |
| EXC    | Excentrique  |
| FNDC5  | Fibronectin type III Domain-Containing Protein 5                       |
| GAP-43 | Growth Associated Protein 43   |
| GD     | Gyrus denté  |
| GS     | Goat serum   |
| GTN    | Glycerol trinitrate  |
| HAT    | histone acétyltransférase  |
| HCAR1  | Hydroxycarboxylic acid receptor 1                                      |
| HDAC   | Histone désacétylases  |
| HIIT   | High intensity interval training                                       |
| HOR    | Horizontal   |
| HUVEC  | Human umbilical vein endothelial cell                                  |
| IFN    | Interféron   |
| IgG    | Immunoglobuline G  |
| IL     | Interleukine   |
| IRMf   | Imagerie par résonance magnétique fonctionnelle                        |
| JNM    | Jonction neuromusculaire   |
| KO     | Knockout   |
| L-NAME | N-nitro-L-arginine methyl ester  |
| LPS    | Lipopolysaccharide   |
| LTD    | Long term depression (dépression à long terme)                         |
| LTP    | Long term potentiation (potentialisation à long terme)                 |
| MA     | Maladie d'Alzheimer  |

|                           |  |
|---------------------------|--|
| MCT                       | Monocarboxylate transporters (transporteurs monocarboxylates)              |
| miARN                     | Micro ARN  |
| MP                        | Maladie de Parkinson   |
| MSS                       | Muscle strié squelettique  |
| MyHC                      | Myosin heavy chain   |
| NGF                       | Nerve growth factor  |
| NMDA                      | N-méthyl D aspartate   |
| NO                        | Nitric oxide (monoxyde d'azote)  |
| NORT                      | Novel object recognition test  |
| NOS                       | Nitric oxide synthase  |
| NT                        | Neurotrophine  |
| OMS                       | Organisation Mondiale de la Santé  |
| Pax                       | Paired box   |
| p-eNOS <sup>Ser1177</sup> | Phosphorylated eNOS at serine 1177   |
| PGC-1 $\alpha$            | Peroxisome Proliferator Activator Receptor $\gamma$ Coactivator-1 $\alpha$ |
| PI3                       | Phosphatidyl-inositol 3  |
| PSD-95                    | Postsynaptic density protein 95  |
| p-TrkB <sup>Tyr816</sup>  | Phosphorylated tropomyosin related kinase B                                |
| RT-qPCR                   | Real-Time Quantitative Reverse Transcription polymerase chain reaction     |
| SED                       | Sédentaires  |
| Shc                       | Src homology 2 domain containing transforming protein                      |
| SHR                       | Spontaneously hypertensive rat   |
| SIRT                      | Sirtuine   |
| SNA                       | Système nerveux autonome   |
| SNC                       | Système nerveux central  |
| SNP                       | Système nerveux périphérique   |
| SS                        | Shear stress   |
| SYN                       | Synaptophysine   |
| SYP                       | Synapsine  |
| SYT                       | Synaptotagmine   |
| TBST                      | Tris-Buffered-Saline and Tween 20  |
| TNF                       | Tumor necrosis factor  |
| t-PA                      | Tissue plasminogen activator ou activateur tissulaire du plasminogène      |
| TrkB                      | Tropomyosin related kinase B   |
| TrkB-FL                   | Tropomyosin related kinase B full length                                   |
| TrkB-T1/T2                | Tropomyosin related kinase B truncated 1/2                                 |
| VEGF                      | Vascular endothelial growth factor   |
| VMA                       | Vitesse Maximale Aérobie   |
| VO <sub>2</sub> max       | Consommation maximale en oxygène lors d'un effort                          |
| vWF                       | Von Willebrand Factor  |
| WB                        | Western blotting   |

## Résumé

L'exercice physique (EX) est reconnu comme la stratégie non pharmacologique la plus efficace pour améliorer la santé cérébrale. Les études menées chez l'Homme et l'animal s'accordent pour impliquer le brain-derived neurotrophic factor (BDNF), une neurotrophine dont les taux cérébraux augmentent en réponse à l'EX et qui est unanimement reconnue comme une molécule de signalisation cruciale de la neuroplasticité. Principalement exprimé par les neurones, le BDNF est également très exprimé par la cellule endothéliale et la cellule musculaire. Très largement sollicités lors d'un effort physique, l'endothélium et le muscle pourraient intervenir dans les effets positifs induits par l'EX. Bien qu'il existe aujourd'hui un consensus sur l'implication du BDNF dans les effets cérébraux de l'EX, il n'en existe pas concernant les modalités d'EX à pratiquer pour optimiser de manière efficace la plasticité cérébrale. Dans ce contexte, les objectifs de ces travaux étaient de déterminer l'impact des modalités de l'EX sur les expressions protéiques de BDNF dans différents territoires (cerveau, endothélium, muscle) et d'étudier les mécanismes à l'origine de l'augmentation de BDNF en réponse à l'EX.

Nos résultats montrent que 1) l'expression du BDNF dans des vaisseaux périphériques de même territoire vasculaire (diamètre interne différent) est similaire en réponse à l'EX et majoritairement d'origine endothéliale, 2) l'augmentation de l'expression cérébrale de BDNF en réponse à l'EX dépend de l'intensité de l'EX, mais pas du type de contraction (excentrique/concentrique), 3) la mémoire est restaurée par un EX de forte intensité, 4) l'EX n'impacte pas l'expression musculaire de BDNF, mais augmente l'expression du précurseur de l'irisine (FNDC5), 5) l'expression du BDNF dépend de la composition du muscle en fibres musculaires, 6) les effets cérébraux de l'intensité de l'EX ne semblent pas être reliés à la surexpression de l'irisine musculaire.

En conclusion, nos données démontrent que l'EX impacte positivement l'expression endothéliale, cérébrale mais pas musculaire de BDNF. Les résultats mettent en évidence l'importance du paramètre intensité de l'EX sur les taux cérébraux de BDNF. Enfin, selon nos données obtenues, l'irisine et le BDNF musculaires ne semblent pas être impliqués dans l'augmentation cérébrale de BDNF en fonction de l'intensité de l'EX.

Mots clés : BDNF, exercice physique, endothélium, muscle, neuroplasticité

## Abstract

Physical exercise (EX) is recognized as the most potent non-pharmacological strategy to positively enhance brain health. From Human and animal studies there is a consensus to involve brain-derived neurotrophic factor (BDNF), a neurotrophin strongly expressed in response to EX and implicated in neuroplasticity mechanisms. Mainly expressed by neurons, BDNF is also expressed by endothelial and muscle cells. Largely sought during a physical effort, endothelium and skeletal muscle could be involved in positive effects induced by EX. Although there is a real consensus about BDNF and cerebral effect of EX, the typology of the better regimen of EX to enhance cerebral plasticity is not known. In this context, objectives of this works were to determine the impact of EX modalities on BDNF protein expression in different territory (brain, endothelium and muscle) and to identify mechanisms related in BDNF increases in response to EX.

Our results showed that 1) BDNF expression in peripheral vessels from the same vascular territory (distinct internal diameter) is similar in response to EX, 2) cerebral BDNF increases induced by EX is dependent on EX intensity but not on the type of contraction (eccentric/concentric), 3) memory is restored by high intensity EX, 4) after EX, BDNF muscular expression is unchanged while the precursor of irisine (FNDC5) expression is increased, 5) BDNF expression depends on muscular fibers typology, 6) cerebral beneficial effects of EX intensity is might not be related to muscular irisine production.

In conclusion, our data demonstrated that EX positively impact endothelial, cerebral but not muscular BDNF expression. Results highlighted the importance of the intensity parameter of EX on cerebral BDNF levels. Finally, according to our data, irisine and BDNF from the muscle might not be related to the cerebral increases of BDNF induced by EX intensity.

Key words: BDNF, physical exercise, endothelium, muscle, neuroplasticity

## Introduction générale

A l'heure actuelle, la sédentarité est un véritable problème de santé publique mondiale et est classée comme le 4<sup>e</sup> facteur de risque de décès dans le monde. De nombreuses campagnes centrées sur la santé luttent aujourd'hui contre la sédentarité en sensibilisant la population à allier l'exercice physique (EX) à une alimentation saine. L'EX est reconnu comme une stratégie non médicamenteuse efficace pour promouvoir la santé et prévenir les pathologies. En effet, pratiquer régulièrement de l'EX réduirait les risques de développer des maladies cardiovasculaires, métaboliques, chroniques mais également des pathologies cérébrales. Principalement basées sur les bénéfices cardiovasculaires, une pléthore d'études démontre également aujourd'hui les avantages cérébraux induits par l'EX. Il est même admis que pratiquer de l'EX tout au long de sa vie influence positivement à la fois la cognition et la santé mentale. Ces effets sont constatés quel que soit l'âge, le sexe de l'individu et visent à réduire les processus de déclin cognitifs liés à l'âge ainsi que le risque de développer des pathologies neurodégénératives.

De façon plus détaillée, l'EX stimule les processus de neurogenèse, synaptogenèse, vasculogenèse, se traduisant à l'étage fonctionnel par une amélioration des processus d'apprentissage et de mémoire. Les études menées chez l'Homme et l'animal s'accordent pour impliquer le BDNF (Brain-derived neurotrophic factor) une neurotrophine dont les taux cérébraux augmentent après l'EX et qui est unanimement reconnue comme une molécule de signalisation cruciale de la neuroplasticité. En effet, ce peptide, via sa fixation spécifique aux récepteurs TrkB (Tropomyosin related kinase B) est impliqué dans le développement cérébral et est désigné comme le médiateur clé des processus neuroplastiques chez l'adulte. Initialement découvert dans le cerveau, le BDNF est également exprimé par d'autres types tissulaires/cellulaires à l'étage cérébral et périphérique. Parmi ces autres sources, l'endothélium (périphérique et cérébral) et le muscle squelettique sont des sources non négligeables de BDNF. En effet, le laboratoire a été le premier à montrer *in vivo* que le BDNF était présent au niveau du système cardiovasculaire avec des taux comparables aux taux cérébraux. De plus, les taux cérébraux sont représentés pour moitié par le BDNF localisé dans les microvaisseaux cérébraux. Ces sources (cerveau, endothélium) sont principalement stimulées lors de l'EX, les désignant ainsi comme possiblement à l'origine des effets positifs de

l'EX sur la santé cérébrale. Néanmoins, les rôles du BDNF ont été principalement définis au niveau cérébral et plus spécifiquement à l'étage du neurone, limitant ainsi les interprétations de son expression dans les autres tissus.

D'autre part, bien qu'il existe aujourd'hui un consensus sur l'implication du BDNF dans les effets cérébraux de l'EX, il n'en existe pas concernant les modalités d'EX à pratiquer pour améliorer de façon efficace la plasticité cérébrale. Ainsi, plusieurs études ont évalué l'influence des différents paramètres de l'EX, tels que la durée, l'intensité, la fréquence, mais l'absence d'un protocole standardisé d'EX limite leurs interprétations. Enfin, même s'il est clair que l'EX conduit à des effets neuroplastiques via l'expression de BDNF, les mécanismes sous-jacents à l'origine de l'augmentation induite par l'EX ne sont pas clairement établis. La régulation de l'expression de BDNF semble être conduite par l'association de différents processus tels que l'activité neuronale, le flux sanguin cérébral, la production de molécules issues du muscle mais également l'intervention de facteurs épigénétiques.

Dans ce contexte, mon travail de thèse s'articulait autour de trois parties :

1) La première partie a consisté à comparer l'expression endothéliale de BDNF dans les vaisseaux périphériques et à évaluer la réponse de l'endothélium périphérique après un entraînement physique de 7 jours sur tapis roulant chez le rat,

2) La seconde partie a été consacrée à l'effet des modalités de l'EX sur la production cérébrale de BDNF et la mémoire. Les objectifs étaient d'une part i) d'étudier l'impact de l'intensité de l'EX et les modalités de contractions sur la voie de signalisation du BDNF ii) de mettre au point des tests comportementaux chez l'animal afin d'évaluer les fonctions cognitives,

3) La dernière partie de mon projet de thèse a été consacrée à l'étude des expressions musculaires de BDNF et d'une myokine, l'irisine. Leurs productions ont été caractérisées en condition basale et après un EX, dans deux muscles présentant une répartition de fibres distincte, le muscle soléaire et le muscle gastrocnémien.

Ce manuscrit comprend

- Un état de l'art articulé autour de trois axes :
  - L'exercice physique
  - Le BDNF
  - Le lien entre BDNF et exercice physique
- Une partie « matériels et méthodes » développant les techniques que j'ai eu à mettre au point au laboratoire durant mon travail de thèse
- La présentation de 3 publications dont deux acceptées dans des journaux indexés
- Les résultats expérimentaux de travaux préliminaires que j'ai initié en dernière année de thèse
- Une discussion générale et perspectives

# *Partie 1 – Etat de l'art*

## A. L'Exercice Physique

### 1. Données générales

Avant de pouvoir décrire les bénéfices de l'exercice, il est important de distinguer les termes Exercice physique (EX) et Activité physique (AP). En effet, l'AP, définie selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme « *tout mouvement corporel produit par les muscles squelettiques, responsable d'une augmentation de la dépense énergétique* », désigne un terme plus généraliste et concerne la réalisation d'un effort physique tel que jardiner, courir, marcher ou encore bricoler. L'EX apparaît plutôt comme une « sous-classification » de l'AP, puisque cet effort peut être structuré, planifié et répété avec pour objectif, en général, d'améliorer ou maintenir la condition physique. Ainsi, l'EX peut être caractérisé par la durée, la fréquence, l'intensité et peut être pratiqué en conditions aérobie ou anaérobie.

Pratiquer un exercice physique permet de lutter contre la sédentarité, qui selon l'OMS, est actuellement un des problèmes majeurs de santé publique mondiale, puisque c'est le 4<sup>e</sup> facteur de risque de décès dans le monde. Pour éviter toute confusion, le terme exercice physique (EX) sera utilisé tout au long de ce manuscrit et les études relatant de l'effet de l'EX seront décrites.

Aujourd'hui, l'EX est reconnu comme la stratégie non pharmacologique la plus efficace pour promouvoir la santé et prévenir le développement de nombreuses pathologies. Quels que soient l'âge, le sexe et la condition physique de l'individu, les bénéfices de l'EX sur la santé sont incontestables. Pour autant, moins de la moitié de la population française pratique un niveau d'EX suffisant. Dans la prévention primaire des pathologies, la pratique régulière d'un EX est associée à une réduction des risques de survenue des maladies cardiovasculaires (hypertension, cardiopathie, athérosclérose), métaboliques (obésité, diabète de type 2), chroniques (cancer, diabète de type 2) mais également cérébrales. Les professionnels de santé sont, depuis 2017, en mesure de prescrire la pratique d'EX adaptés à la pathologie, dans le cadre de soins de patients atteints d'affections de longue durée.

Bien que les bénéfices sur la santé cardiovasculaire et métabolique de l'EX aient conduit à une pléthore de travaux, ce n'est que depuis deux décennies que l'intérêt s'est porté, de la part de la communauté scientifique, sur les effets cérébraux de l'EX. Ainsi, dans cette première

partie du manuscrit, les travaux menés chez l'Homme et l'animal et les techniques mises en œuvre pour investiguer les bénéfices cérébraux de l'EX sont développés.

## **2. Exercice physique et santé cérébrale**

Il est maintenant admis que pratiquer de l'EX tout au long de la vie procure des effets bénéfiques sur le cerveau (Hotting *et al.* 2013), en influençant positivement à la fois la cognition et la santé mentale. Ces effets multiples sont plus ou moins marqués en fonction de l'âge de l'individu, mais tendent globalement à prévenir la survenue de désordres psychiques et cognitifs (Sofi *et al.* 2011; Mandolesi *et al.* 2018), tels que les troubles du comportement, de l'humeur, les addictions et les maladies neurodégénératives.

### **a. Amélioration des fonctions cognitives**

Les fonctions cognitives sont définies comme la capacité de notre cerveau à communiquer, percevoir l'environnement, se concentrer, se souvenir d'un événement et produire des mouvements. Ces fonctions sont assurées par différentes zones cérébrales en étroite connexion, pour répondre aux stimuli environnementaux. Pour apprécier les effets de l'EX sur le cerveau, différentes mesures sont réalisées de manière plus ou moins invasives, en fonction du modèle d'étude et de la procédure. Chez l'Homme, les changements structuraux sont étudiés par les techniques d'imagerie notamment l'IRM fonctionnelle (Image par résonance magnétique), permettant d'estimer les changements de volumes des structures dites « cognitives », des volumes de matières grise et blanche et l'irrigation de ces structures. Des paramètres neurochimiques comme la mesure des taux circulants de facteurs neurotrophiques, de neurotransmetteurs ou de métabolites peuvent témoigner de l'impact de l'EX. Néanmoins, l'évaluation de l'aspect fonctionnel de ces changements structuraux et biochimiques, ne peut être appréciée que par des tests comportementaux. Malgré des régimes d'EX différents justifiant l'hétérogénéité des résultats retrouvés dans la littérature, l'EX, qu'il soit pratiqué de façon aiguë ou chronique, procure des effets positifs sur les fonctions cognitives que ce soit chez l'enfant, l'adulte ou la personne âgée.

### ***Chez l'enfant***

Chez l'enfant, les fonctions exécutives et les processus d'attention, sont améliorés par la pratique de l'EX et corrélés à une meilleure réussite scolaire (Plunzevic 2012; de Greeff *et al.* 2018). D'autres travaux rapportent également une amélioration des processus de mémoire et d'apprentissage notamment la mémoire de travail et la mémoire visuo-spatiale (Kamijo *et al.* 2011; Bidzan-Bluma *et al.* 2018; de Greeff *et al.* 2018). Au niveau structural, la réalisation d'un EX intense (supérieur à 70 % de la VO<sub>2</sub> max<sup>1</sup>) chez des enfants âgés de 9-10 ans, comparée à une pratique légère (inférieure à 30% de la VO<sub>2</sub> max), augmente à la fois le volume de la substance blanche cérébrale (corona radiata, corps calleux) et le volume de l'hippocampe qui est associé à une amélioration de la mémoire associative (Chaddock *et al.* 2010; Chaddock *et al.* 2014). De façon étonnante, l'augmentation du volume de la substance blanche soulève la possibilité que les enfants ayant une condition physique élevée aient une conduction neuronale plus efficace entre les régions impliquées dans la cognition (Chaddock *et al.* 2014). Par ailleurs, la durée de l'effort semble moduler les fonctions cognitives, puisqu'un EX long (40 min/jour, 5 fois/semaines, 5 semaines) conduit à une amélioration des fonctions exécutives et une activité neuronale plus marquée dans les aires frontales de ces enfants comparés à ceux réalisant un EX plus court (20 min/jour, 5 fois/semaine, 5 semaines) (Davis *et al.* 2007). De manière globale, la pratique de l'EX chez l'enfant est associée à un meilleur développement des zones cérébrales, une amélioration et une préservation de la santé cognitive à l'âge adulte (Plunzevic 2012; Bidzan-Bluma *et al.* 2018). En d'autres termes, l'EX durant l'enfance pourrait augmenter la récupération du cerveau durant la vie et permettre une résistance de celui-ci aux troubles neurologiques grâce à une forme de réserve cognitive. Toutefois, les études sont peu nombreuses et l'étude du lien entre EX et cognition pendant l'enfance est très complexe en raison de nombreux facteurs extérieurs intervenant durant le développement.

### ***Chez l'adulte***

L'étude systématique menée par Cox et ses collaborateurs Cox *et al.* (2016) sur des adultes âgés de 18 à 50 ans montre que la pratique chronique de l'EX promeut les fonctions exécutives, la vitesse de traitement de l'information, l'attention et la mémoire. Chez des jeunes adultes de 22 ans, un EX incrémental aigu suffit pour augmenter la mémoire à court terme

---

<sup>1</sup> La Vo<sub>2</sub> max est la consommation maximale en oxygène lors d'un effort physique.

évaluée par le face-name matching task<sup>2</sup> (Griffin *et al.* 2011). En revanche, lorsqu'il s'agit de la mémoire à long terme, seul un EX régulier (4 semaines) permet d'avoir un effet positif sur la tâche de reconnaissance d'objet chez des sujets âgés de 18 à 30 ans (Hopkins *et al.* 2012). Ces effets peuvent être reliés à une augmentation du volume sanguin dans l'hippocampe, une réduction de son atrophie, une diminution du déclin cognitif causé par l'âge et également une production de facteurs neurotrophiques en réponse à l'EX (Pereira *et al.* 2007; Hillman *et al.* 2008; Griffin *et al.* 2011; Chieffi *et al.* 2017). Chez des personnes âgées de plus de 50 ans, une amélioration de la mémoire est également observée en lien avec des changements structuraux importants. En effet, par IRMf, une augmentation à la fois du volume de matière grise dans les zones corticales frontales, pariétales, temporales et du volume de matière blanche dans les régions du cerveau situées entre les lobes frontaux et pariétaux, a été démontrée (Colcombe *et al.* 2003). Un EX chronique augmente également le volume de l'hippocampe, spécifiquement dans la partie antérieure contenant le gyrus denté (GD)<sup>3</sup> (Erickson *et al.* 2011; Erickson *et al.* 2014), le volume des régions du lobe frontal impliquées dans la mémoire de travail, l'inhibition des informations non pertinentes et le contrôle de l'attention (Colcombe *et al.* 2006). Après 1 an d'EX, une augmentation de 7% du volume de l'hippocampe a été observée chez le groupe d'individus soumis à l'EX contre une perte de 1 à 2% chez le groupe sédentaire (SED) (Erickson *et al.* 2011). Une corrélation positive a également été retrouvée entre l'élévation du volume de l'hippocampe et l'amélioration de la mémoire spatiale après EX (Erickson *et al.* 2011). Par ailleurs, le risque de développer des maladies neurodégénératives chez l'adulte est inversement associé à la quantité d'EX pratiquée au cours de la vie. D'après des études épidémiologiques, l'EX réduirait de 20 à 40% le risque de développer la maladie d'Alzheimer (MA) (Paillard *et al.* 2015) et la maladie de Parkinson (MP) (Xu *et al.* 2010; Paillard *et al.* 2015). Il semblerait que l'effet neuroprotecteur puisse dépendre de l'association de plusieurs types d'entraînement, impliquant des EX aérobie, de force musculaire et de coordination (Paillard *et al.* 2015).

---

<sup>2</sup> Ce test consiste à présenter des images de visages associées à un nom, durant quelques secondes (3.5 sec), lors de la phase d'encodage. Après des phases de distraction et de rappel, le sujet doit être capable de donner verbalement le nom de la personne lorsque le visage lui est à nouveau présenté à l'écran.

<sup>3</sup> Le gyrus denté est une structure située sous l'hippocampe contenant des cellules souches. C'est un lieu de neurogenèse chez l'adulte.

Le déclin cognitif, bien qu'inévitable après un certain âge, est un phénomène physiologique résultant de la dégénérescence neuronale. Dans certains cas, cette neurodégénérescence peut entraîner des troubles cognitifs légers ou des formes plus graves de démence, comme la MA. Chez des patients atteints de la MA, une diminution des dépôts de la protéine amyloïde en réponse à l'EX a été constatée, limitant l'atrophie des structures cérébrales. L'effet neuroprotecteur de l'EX est également retrouvé dans la MP puisque l'EX ralentirait l'évolution de la maladie en favorisant l'angiogenèse et l'expression de facteurs neurotrophiques (Paillard *et al.* 2015). Enfin, en cas d'accident vasculaire cérébral (AVC), la pratique de l'EX permet une meilleure récupération fonctionnelle chez des patients post-AVC présentant des troubles cognitifs (Saunders *et al.* 2014; Oberlin *et al.* 2017).

#### **b. Amélioration du bien-être psychique**

Le bien-être psychique est défini lorsque les états émotionnels et mentaux sont en complète harmonie. L'EX permet d'atteindre et de maintenir cet état, en améliorant l'humeur, en réduisant le stress et en augmentant la confiance en soi par exemple. Même s'il apparaît clair que l'EX agit de manière positive sur la santé mentale, les facteurs (biochimiques, psychosociaux, psychologiques) mis en jeu sont nombreux et opèrent en étroite interaction. Pour évaluer les conséquences de sa pratique sur la santé mentale, différentes mesures peuvent être réalisées telles que la mesure du flux sanguin cérébral, de la sécrétion de neurotransmetteurs impliqués dans l'humeur, de facteurs neurotrophiques et de l'apport d'oxygène aux structures cérébrales. A l'aide de tests comportementaux, de grilles de scores et de questionnaires, l'humeur et le niveau de stress peuvent également être estimés (Hopkins *et al.* 2012). En réponse à l'EX, les neurotransmissions sérotoninergique, dopaminergique et les taux de facteurs neurotrophiques sont augmentés (Dey *et al.* 1992; Lin *et al.* 2013). Une augmentation du flux sanguin cérébral, une réduction de la tension musculaire et une augmentation de la concentration sérique en endocannabinoïdes sont également les témoins des bienfaits psychiques de la pratique sportive (Mandolesi *et al.* 2018).

En résumé, les effets positifs de l'EX sont retrouvés à différents stades de la vie et se traduisent principalement par une amélioration de l'humeur, une réduction de l'anxiété, du stress, une stabilité émotionnelle accrue, une meilleure estime de soi et une évaluation positive des « autres » favorisant ainsi les relations sociales.

En conditions pathologiques, comme la dépression, l'EX est utilisé comme une stratégie non médicamenteuse pour renforcer l'humeur en stimulant les neurotransmissions sérotoninergique et dopaminergique. Sa pratique est notamment recommandée en combinaison d'un traitement pharmacologique, tels que les inhibiteurs de la recapture de la sérotonine. A cet égard, des études menées chez le rongeur ont souligné un effet synergique de l'EX lors de la prise d'antidépresseurs sur la production de facteurs neurotrophiques (Russo-Neustadt *et al.* 1999; Russo-Neustadt *et al.* 2000; Russo-Neustadt *et al.* 2004). Une étude portant sur des patients souffrant de troubles dépressifs majeurs met en évidence une réduction du score de dépression après 10 jours d'EX (Knubben *et al.* 2007), ce score restant plus bas chez les patients poursuivant un programme d'EX sur le long terme comparativement aux patients contrôles (Martinsen 1990). D'autre part, l'EX permet également de traiter les addictions sévères aux drogues (cannabis, alcool, cigarette). Des personnes utilisant des drogues de manière abusive, témoignent que la pratique de l'EX les aide à adopter un comportement plus sain et à réduire la prise de drogues. Pour exemple, une relation inversement proportionnelle entre le tabagisme et le niveau d'EX pratiqué a été observée. Toutefois, ces résultats sont discutables lorsqu'il s'agit de la dépendance à l'alcool (Nock *et al.* 2017).

L'ensemble des bénéfices biologiques, structuraux et fonctionnels de l'EX sur la cognition et le bien être psychique est résumé dans la figure 1.

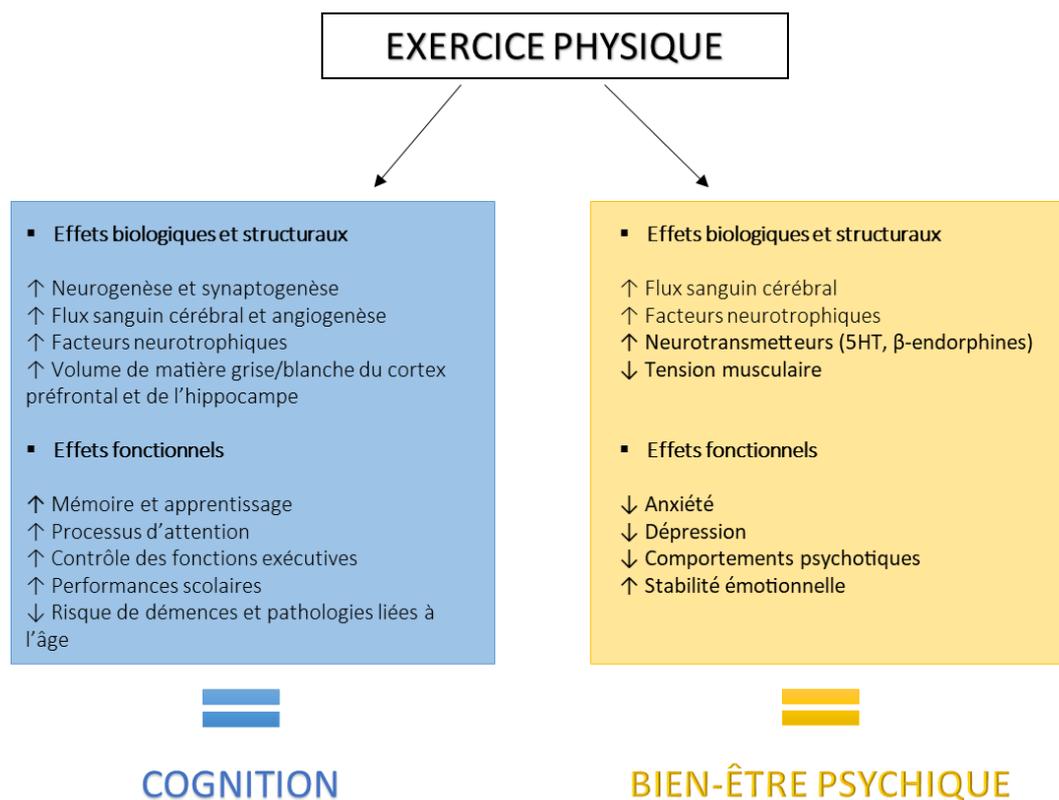


Figure 1 : Représentation des effets positifs de l'EX sur la cognition et la santé mentale.

D'après la revue de Mandolesi *et al.* (2018).

### 3. Modifications cellulaires en réponse à l'EX

Dans le cadre de l'étude de la réponse cellulaire à l'EX, le modèle animal le plus utilisé est le rongeur. Classiquement, deux protocoles sont utilisés et consistent à réaliser l'effort soit de manière volontaire, avec un accès libre à une roue d'entraînement, soit de manière imposée, sur un tapis roulant. L'utilisation de la roue en libre accès est la méthode la plus couramment étudiée car elle est réalisée de manière volontaire sans induction d'un stress potentiel. En revanche, une forte variabilité interindividuelle concernant la distance parcourue dans la roue est constatée et son utilisation ne permet pas de moduler la vitesse, la durée, la fréquence et l'inclinaison de la course, contrairement au tapis roulant. D'autres formats peuvent être

également utilisés comme la nage ou l'utilisation du rotarod<sup>4</sup> mais ne feront pas l'objet d'un développement approfondi dans ce manuscrit.

Au niveau cérébral, les modifications cellulaires observées sont à l'origine de la plasticité cérébrale, c'est à dire la capacité du cerveau à s'adapter à son environnement. En réponse à l'EX, les processus cellulaires mis en jeu sont classiquement reliés à une augmentation des taux cérébraux d'un facteur neurotrophique, le brain-derived neurotrophic factor (BDNF), élément clé de la neuroplasticité (Neeper *et al.* 1995; Gomez-Pinilla *et al.* 2002; Vaynman *et al.* 2003; Vivar *et al.* 2013). Toutefois, la description du BDNF et le lien entre BDNF et EX ne seront abordés respectivement que dans les parties 2 et 3 du manuscrit.

### a. Neurogenèse

La neurogenèse consiste en la différenciation d'une cellule souche neurale en une cellule souche neuronale (neuroblaste) puis en neurone mature. Ce mécanisme, très prépondérant durant le développement du système nerveux (SN), est également retrouvé à l'âge adulte dans le GD et la zone sous-ventriculaire (dont les néo-neurones sont ensuite dirigés vers les bulbes olfactifs). Des marqueurs peuvent être utilisés pour étudier les différents stades de différenciation et de prolifération de ces cellules, comme le Ki-67 (marqueur de prolifération), le BrdU (bromo-désoxy-uridine, marqueur de prolifération), la DCX (doublecortine, marqueur des neuroblastes) et le NeuroD1 (marqueur de différenciation). La différenciation neuronale peut également être évaluée lorsque le marquage BrdU est couplé à un marqueur spécifique des neurones matures comme le NeuN (Neuronal Nuclei).

Les travaux de van Praag, Kempermann, *et al.* (1999) ont mis en évidence pour la première fois chez la souris, une augmentation de la prolifération neuronale (marquage au BrdU) dans le GD, après un accès libre à une roue. Par la suite, ces résultats ont été confirmés par d'autres travaux rapportant une neurogenèse exclusivement dans le GD mais pas dans la zone sous-ventriculaire (Brown *et al.* 2003; Farmer *et al.* 2004; Inoue *et al.* 2015) ainsi qu'une prolifération/différenciation neuronale après un EX volontaire ou imposé (Kim *et al.* 2003; Farmer *et al.* 2004; Eadie *et al.* 2005; Lou *et al.* 2008; Inoue *et al.* 2015). L'induction de la neurogenèse ne semble pas nécessiter une pratique prolongée de l'EX, puisque quatre jours

---

<sup>4</sup> Le rotarod est un appareil constitué d'un cylindre rotatif dans lequel le rongeur est placé et soumis à une activité locomotrice imposée. Il est principalement utilisé pour étudier la coordination motrice, l'équilibre et la fatigue des rongeurs.

d'EX suffisent pour augmenter la prolifération des précurseurs neuronaux (Kim *et al.* 2003; Overall *et al.* 2013). En revanche, une pratique légère ou modérée est nécessaire pour obtenir des effets positifs sur la différenciation et la prolifération neuronales, comme en témoignent les études menées chez le rat (Kim *et al.* 2003; Lou *et al.* 2008; Inoue *et al.* 2015). En effet, bien qu'une augmentation du volume du GD soit constatée chez les animaux soumis à un EX intense (40 m/min pendant 6 semaines) ou modéré (15 m/min pendant 6 semaines), seul l'EX modéré augmente significativement la prolifération (BrdU+) et la différenciation en neurones matures (BrdU+/NeuN+)(Inoue *et al.* 2015). Des résultats similaires ont été obtenus chez la souris, montrant un effet significativement plus important de l'EX modéré comparé à l'EX intense, sur la prolifération cellulaire (Marquages BrdU+ et Ki-67+) (So *et al.* 2017). Enfin, en conditions pathologiques comme l'ischémie (Matsuda *et al.* 2011; Liu *et al.* 2018) ou l'obésité (Han *et al.* 2019), l'EX augmente également la neurogenèse.

Les mécanismes sous-jacents régulant la neurogenèse induite par la course sont en grande partie mal connus. Toutefois, quelques études ont mis en évidence différents mécanismes qui semblent réguler la neurogenèse en réponse à l'EX. Une corrélation entre le flux sanguin cérébral dans le DG et la prolifération neuronale en réponse à l'EX a d'abord été observée chez la souris (Pereira *et al.* 2007). Par la suite, l'expression du facteur PF-4 (facteur-4 plaquettaire) induite par l'activation plaquettaire, augmente la prolifération et la différenciation cellulaire des précurseurs neuronaux exclusivement dans le GD après 1 jour d'EX. En revanche, la déplétion plaquettaire chez la souris empêche la prolifération des progéniteurs dépendante de l'EX (accès libre à la roue pendant 4 jours) (Leiter *et al.* 2019). Ces données soutiennent l'hypothèse d'un lien entre l'activation plaquettaire induite par l'EX et la capacité des facteurs d'origine plaquettaire à moduler spécifiquement les progéniteurs neuronaux en cas d'EX. Enfin, une étude mimant les effets de l'EX par l'injection de lactate montre une augmentation de la différenciation neuronale par le double marquage BrdU+/NeuN+. En bloquant les transporteurs cérébraux du lactate, les MCT (Monocarboxylate transporter), avec le 4-CIN (alpha-cyano-4-hydroxycinnamate), le double marquage est diminué dans le GD, alors que l'utilisation d'un agoniste des récepteurs de l'hydroxycarboxylic acid receptor 1 (HCAR1) dont le ligand endogène est le lactate, n'impacte pas la neurogenèse. Ces résultats suggèrent que le lactate participe à la neurogenèse induite par l'EX, exclusivement via les transporteurs MCT (Lev-Vachnish *et al.* 2019).

## b. Synaptogenèse

La création de nouvelles connexions entre le bouton axonique d'un neurone (terminaison axonale, présynaptique) et les dendrites (postsynaptique) d'un autre neurone caractérise la synaptogenèse. Cette communication neuronale peut être appréciée par la mesure de l'expression de protéines pré- et post- synaptiques telles que la synaptophysine (SYN, pré-synaptique), la synaptotagmine (SYT, pré-synaptique), la synapsine (SYP, pré-synaptique), la PSD-95 (postsynaptic density protein 95, post-synaptique), la GAP-43 (Growth Associated Protein 43), la syntaxine ainsi que la mesure de la longueur des dendrites et le nombre des épines dendritiques des neurones. L'EX stimule ce phénomène à la fois dans les régions impliquées dans la cognition (hippocampe, cortex préfrontal) et la motricité (cortex, striatum, cervelet) (Ferreira *et al.* 2010, 2011). Les études s'accordent à montrer que l'EX, qu'il soit volontaire ou imposé, augmente l'expression des protéines SYN, SYP et SYT dans l'hippocampe (Vaynman *et al.* 2006; Liu *et al.* 2008; Liu *et al.* 2009; Cefis *et al.* 2019) et le cortex sensorimoteur (Pedard *et al.* 2019). Les études de Chen *et al.* (1998) montrent chez la souris qu'un EX prolongé de 21 mois dans une roue d'EX, augmente significativement l'expression des marqueurs GAP-43 et SYN dans l'hippocampe. L'expression des protéines synaptiques est influencée par l'EX en fonction du rôle de celle-ci. En effet, la syntaxine et la SYP intervenant dans l'exocytose des vésicules synaptiques sont largement exprimées après un EX de 3 et 7 jours et tendent à diminuer à 28 jours. En revanche, l'inverse est constaté pour l'expression de la SYT, puisqu'elle intervient dans la formation des vésicules, nécessitant un temps plus long (Molteni *et al.* 2002). De façon globale, les augmentations de SYT, SYP et de syntaxine persistent après 28 jours d'EX (Gomez-Pinilla *et al.* 2002; Molteni *et al.* 2002) mais peuvent être abolies suite à l'injection d'un bloqueur de l'activité synaptique, le KN-62 (inhibiteur de la CAMKII<sup>5</sup>) (Vaynman *et al.* 2003). L'étude de Ferreira *et al.* (2010) conforte cet argument en rapportant que les expressions de la SYP et la SYN diffèrent en fonction du nombre de jours d'EX pratiqué (3, 7, 15 jours) et la structure étudiée (striatum, cervelet, cortex). Bien que différentielles, les expressions sont en accord avec l'implication de ces protéines dans la formation et l'exocytose des vésicules synaptiques. Enfin, chez la souris, l'accès libre à une roue pendant 4 semaines augmente le nombre de synapses sur les épines dendritiques des cellules granulaires et

---

<sup>5</sup> Les CaMKII sont des protéines kinases Ca<sup>2+</sup>/calmoduline-dépendantes impliquées dans les processus de mémoire et d'apprentissage. Ce point sera développé dans la partie « potentialisation à long terme »

pyramidales de l'hippocampe. Cependant, cet effet est annulé chez des animaux knockout (KO) pour le gène UCP<sup>6</sup> (Uncoupling protein), suggérant que la synaptogenèse induite par l'EX dépend de processus mitochondriaux (Dietrich *et al.* 2008).

Au laboratoire, nous avons également montré chez le rat que l'EX imposé, en descente ou en montée, d'intensité modérée ou soutenue, sur un tapis roulant pendant 7 jours, augmente l'expression protéique de la SYN dans les zones corticales et hippocampiques (Cefis *et al.* 2019; Pedard *et al.* 2019). En conditions pathologiques, l'EX imposé d'une durée de 30 ou 60 min par jour après une ischémie focale chez le rat, augmente les expressions hippocampiques et corticales de la SYP de l'hémisphère non ischémié comparé aux rats ischémiés ayant un accès libre pendant 12h à une roue d'entraînement (Ploughman *et al.* 2005). Enfin, en cas d'hypertension, l'expression de la SYN est significativement augmentée dans l'hippocampe et le cortex sensorimoteur de rats hypertendus soumis à un EX imposé de 7 jours comparés à des rats SED hypertendus (Banoujaafar *et al.* 2014; Monnier, Garnier, *et al.* 2017).

### c. Angiogenèse

L'angiogenèse se manifeste par la formation de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux préexistants. Ce processus est contrôlé par l'expression de facteurs produits directement par la cellule endothéliale (CE), dont le plus connu, est le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF). L'angiogenèse est appréciée le plus souvent par l'expression de marqueurs spécifiques de la lame basale (laminine et collagène IV), d'inducteurs comme le VEGF, les angiopoïétines, ou d'inhibiteurs comme l'angiotensine, la thrombospondine 1 mais aussi par la mesure de la densité des capillaires néoformés.

Les travaux de Black *et al.* (1990) menés chez le rat après la réalisation d'une activité locomotrice, montrent une augmentation de la densité des vaisseaux de la couche externe ou moléculaire du cortex cérébelleux impliqué dans la motricité. Cette angiogenèse induite par l'EX a également été constatée dans d'autres régions motrices comme les zones motrices corticales, sous corticales (striatum) et dans l'hippocampe de rats sains (Isaacs *et al.* 1992; Kleim *et al.* 2002; Ding *et al.* 2003; Swain *et al.* 2003; Ding *et al.* 2004; Ding *et al.* 2006; Solvsten

---

<sup>6</sup> Les UCP sont des protéines qui permettent de découpler le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale et donc de la synthèse d'ATP. Elles sont généralement associées à la thermogenèse du tissu adipeux.

*et al.* 2018) ou ayant subi une ischémie cérébrale (Ding *et al.* 2004). L'étude de Ding (2006) réalisée chez des rats âgés de 22 mois, soumis à un EX imposé de 3 semaines sur tapis roulant (15 m/min, 30 min/jour, 6 fois/semaine) montre une augmentation des facteurs angiogéniques (VEGF, angiopoïétines 1 et 2) en lien avec une densité vasculaire plus importante dans le striatum et le cortex fronto-pariétal. Contrairement à la neurogenèse et la synaptogenèse, l'angiogenèse semble être plus marquée lorsque l'EX est pratiqué de manière prolongée (au-delà de trois semaines) comme le souligne les auteurs des études menées respectivement au niveau du cervelet, du cortex et du striatum (Isaacs *et al.* 1992; Swain *et al.* 2003; Ding *et al.* 2004). Par ailleurs, comme indiqué plus tôt, la neurogenèse induite par l'EX est étroitement liée à l'angiogenèse puisque les augmentations de VEGF (Ferrara 2000) et du volume sanguin cérébral sont associées à une augmentation de la prolifération des progéniteurs neuronaux dans le GD. L'induction de l'angiogenèse pourrait s'expliquer par l'élévation des taux circulants de lactate en réponse à l'EX et ce, en lien avec l'augmentation de l'expression de VEGF (E *et al.* 2013). Ces données ont été confortées par celles de Morland *et al.* (2017) qui ont mis en évidence une implication des récepteurs HCAR1 dans les effets pro-angiogéniques de l'EX. En effet, l'administration répétée de lactate et/ou un entraînement par intermittence (5 jours d'EX/semaine, 7 semaines) réalisés chez des souris sauvages, augmentent tous les deux, la densité des capillaires cérébraux dans le cortex sensorimoteur et le GD, via une élévation des taux cérébraux de VEGF. A l'inverse, chez des souris KO pour le gène *hcar1*, l'injection de lactate ou la pratique d'un EX en intermittent n'influence pas l'angiogenèse cérébrale. Alors que l'action du lactate sur la neurogenèse serait MCT dépendante (Lev-Vachnish *et al.* 2019), son effet angiogénique semble être médié par un mécanisme impliquant les récepteurs HCAR1 (Morland *et al.* 2017).

#### **d. La potentialisation à long terme**

La potentialisation à long terme ou long term potentiation (LTP) est un processus de renforcement synaptique entre deux neurones. Ce processus correspond à une augmentation de l'amplitude de la réponse postsynaptique à la suite d'une activation présynaptique courte (inférieure à 1 seconde) et intense (fréquence supérieure à 100 Hz). Elle se divise en deux phases, l'une correspondant à la phase transitoire d'induction et l'autre à la phase de maintien. Ce type de stimulation conduit à une libération accrue du glutamate (neurotransmetteur exciteur) dans la fente synaptique activant les récepteurs postsynaptiques, AMPA (acide

propionique alpha-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole) et NMDA (N-méthyl-D-aspartate) perméables respectivement au potassium ( $K^+$ ) / sodium ( $Na^+$ ) et calcium ( $Ca^{2+}$ ). Bien que l'activation des récepteurs AMPA soit rapide lors de la transmission d'un influx nerveux, celle des récepteurs NMDA nécessite une stimulation intense pour retirer le bouchon de magnésium ( $Mg^{2+}$ ) et être efficace. L'activation des récepteurs NMDA déclenche une entrée massive d'ions  $Ca^{2+}$  activant alors la calmoduline (fixation de 4 ions  $Ca^{2+}$ ). Le complexe  $Ca^{2+}$ - calmoduline déclenche ensuite les voies de signalisation médiées par l'adénylate cyclase et la CaMKII, comme évoqué précédemment, entraînant la stimulation de différentes protéines kinases capables de phosphoryler les récepteurs AMPA et NMDA pour augmenter leur sensibilité et maintenir la LTP. Les protéines kinases activées conduisent également à l'activation de la machinerie génique. Le processus de LTP est résumé dans la figure 2. Ce phénomène est essentiellement retrouvé dans l'hippocampe (Bliss and Gardner-Medwin 1973; Bliss and Lomo 1973), mais également dans le cervelet et l'amygdale (Clugnet *et al.* 1990; Evans 2007).

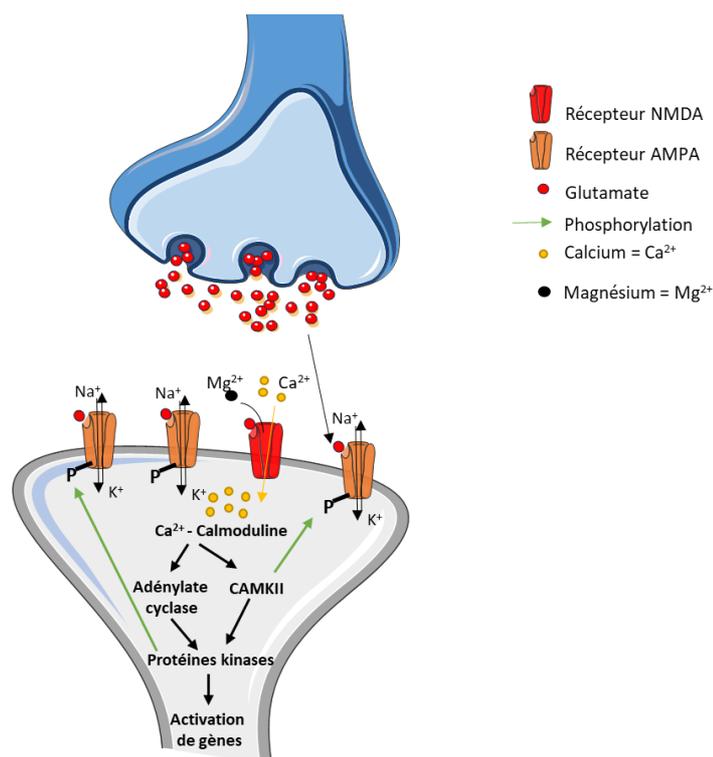
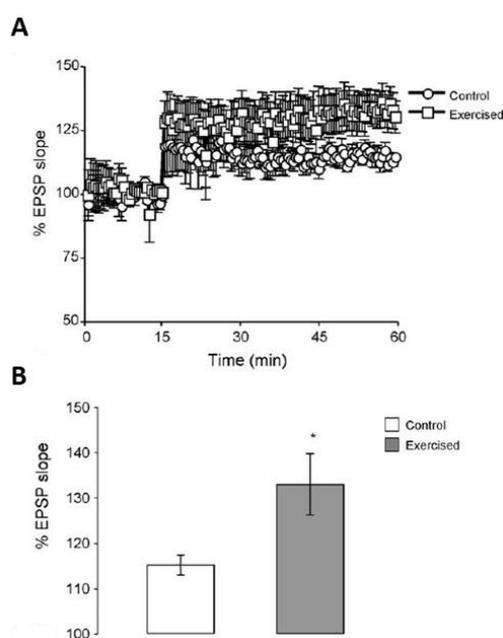


Figure 2 : Représentation schématique de la potentialisation à long terme (LTP).

Selon « le cerveau à tous les niveaux » de l'université de McGill.

Chez l'animal, l'appréciation de la LTP est effectuée par la mesure de l'activité électrique des neurones sur des coupes de cerveau passant par l'hippocampe. En électrophysiologie, la

LTP est déclenchée par une stimulation de haute fréquence de l'axone présynaptique, à l'aide d'une électrode placée sur les collatérales de Schaffer<sup>7</sup>. A titre d'exemple, les travaux d'O'Callaghan *et al.* (2007) mettent en évidence un effet positif de l'EX sur le renforcement synaptique au niveau du GD, chez des rats entraînés 60 min/jour pendant 7 jours sur un tapis roulant à la vitesse de 1 km/h. Les résultats présentés dans la figure 3 montrent une augmentation significative de la réponse postsynaptique dans le GD des rats exercés comparés aux rats contrôles. Plusieurs autres auteurs ont également mis en évidence un effet de l'EX sur la LTP, qu'il soit volontaire ou imposé (van Praag, Christie, *et al.* 1999; Farmer *et al.* 2004; Reisi *et al.* 2010; Liu *et al.* 2011; Vivar *et al.* 2013). Enfin, bien que la LTP ne soit pas évaluée directement, des données démontrent qu'un EX imposé chez la souris augmente l'expression des récepteurs NMDA dans le GD (Park *et al.* 2014).



**Figure 3 : Effet de l'EX sur la LTP dans le GD de l'hippocampe.**

Le graphe A correspond à la réponse post synaptique après une stimulation de haute fréquence des coupes hippocampiques de rats contrôles et exercés. Le graphe B illustre la moyenne des EPSP (excitatory postsynaptic potential) mesurés et représentés dans le graphe A. Une augmentation significative de la réponse postsynaptique chez le groupe exercé comparé au groupe contrôle est observée. \* $p < 0.05$  comparé au groupe contrôle. D'après O'Callaghan *et al.* (2007).

<sup>7</sup> Collatérales axonales émises par les cellules pyramidales de la zone CA3 (Corne d'Ammon), se projetant sur la zone CA1 de l'hippocampe et participant au processus de mémorisation.

#### 4. Les tests comportementaux

Les modifications cellulaires en réponse à l'EX se manifestent par des changements fonctionnels qui sont classiquement évalués par des tests comportementaux chez l'Homme et l'animal. N'ayant travaillé que chez l'animal, cette partie sera exclusivement consacrée aux tests mis au point chez le rongeur (modèle d'étude classique). Les tests les plus utilisés dans la littérature et évaluant les processus de mémoire et d'apprentissage sont décrits ci-dessous.

##### a. Le test de la piscine de Morris (Morris water maze test)

Conçu en 1984 par Morris et ses collaborateurs (Morris 1984), le test de la piscine de Morris permet d'évaluer l'apprentissage, la mémoire spatiale et la mémoire à long terme. Son principe repose sur la capacité de l'animal à retrouver une plateforme placée dans une piscine circulaire, immergée sous une eau opaque (Figure 4A). A l'aide des repères spatiaux et du nombre de sessions d'entraînement réalisées dans la piscine, le temps de latence et la distance parcourue par l'animal pour trouver la plateforme diminuent au cours du temps. De nombreux travaux chez le rongeur ont montré que l'EX, qu'il soit volontaire ou imposé, améliore le temps de latence et la distance parcourue pour trouver la plateforme (van Praag, Christie, *et al.* 1999; Alaei *et al.* 2006; Aguiar *et al.* 2011; Cassilhas *et al.* 2012; Shih *et al.* 2013; Wang *et al.* 2016). A titre d'exemple, la figure 4 illustre des données obtenues par l'équipe d'Aguiar *et al.* (2011) montrant chez la rate âgée de 24 mois que l'EX imposé pendant 4 semaines diminue significativement le temps de latence pour retrouver la plateforme dès le 3<sup>e</sup> essai (Figure 4B). De plus, chez les rates exercées, la distance parcourue pour trouver la plateforme est principalement localisée dans le cadran de la piscine contenant la plateforme comparée aux rates SED (Figure 4C).

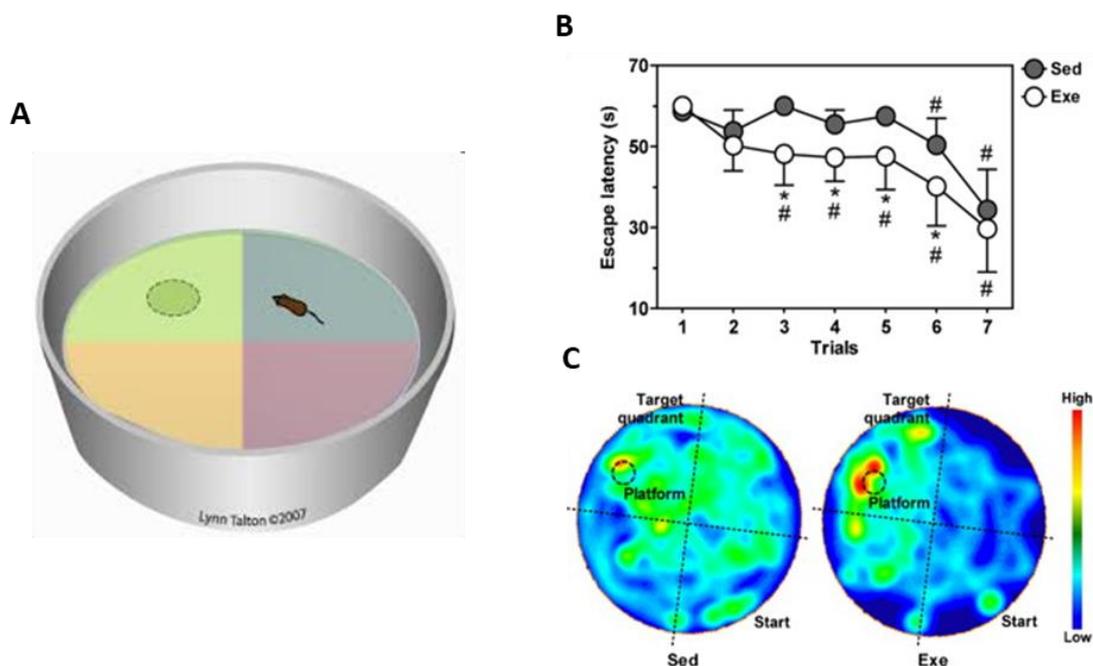


Figure 4 : Effet de l'EX sur la mémoire spatiale évaluée par le test de la piscine de Morris.

Représentation schématique du test de la piscine de Morris (A). Le temps de latence (B) et la locomotion (C) ont été évalués chez les animaux sédentaires (Sed) et exercés (Exe),  $n = 8/\text{groupe}$ . \* $p < 0,05$  comparé aux Sed et # $p < 0,05$  comparé au premier essai (trial). D'après Aguiar *et al.* (2011).

#### b. Le test du labyrinthe de Barnes (Barnes maze test)

Le test du labyrinthe de Barnes permet de mesurer la mémoire de référence<sup>8</sup> spatiale des rongeurs. Le test est réalisé sur une plateforme circulaire, éclairée et percée de petits trous le long de sa circonférence (Figure 5A). L'un de ces trous possède une cavité par laquelle peut s'enfuir l'animal. Pour trouver le trou, l'animal utilise des repères spatiaux situés dans la pièce. Les mesures utilisées ici sont le nombre de trous que le rongeur visite avant de trouver la cavité et le temps qu'il met pour s'échapper. Le test est principalement conçu pour évaluer la mémoire de référence mais peut être modifié pour apprécier la mémoire de travail<sup>9</sup>. Par ailleurs, il présente l'avantage d'être peu anxiogène pour l'animal par rapport aux tests de la piscine de Morris et au labyrinthe à bras radial et ne nécessite pas le jeûne de l'animal (Labyrinthe à bras radial). Les travaux de Lin *et al.* (2015) résumés dans la figure 5, portent sur l'impact de différents régimes d'EX, imposé, volontaire et involontaire<sup>10</sup> sur la démence

<sup>8</sup> La mémoire de référence correspond à la mémoire implicite, dite inconsciente, qui ne fait pas référence à un processus de récupération.

<sup>9</sup> La mémoire de travail est une mémoire à court terme, permettant de stocker et manipuler des informations lors de la réalisation d'une activité.

<sup>10</sup> EX involontaire réalisé par l'utilisation de l'électromyostimulation après anesthésie de l'animal

vasculaire (DV)<sup>11</sup> induite chez le rat. A l'aide du labyrinthe de Barnes, les auteurs ont mis en évidence que quel que soit le type d'EX, le temps de latence pour s'échapper diminue progressivement au cours de chaque essai et est toujours plus faible chez les rats DV soumis à un EX comparé aux rats DV sédentaires (Figure 5B). La moyenne des temps de latence obtenus par groupe met en évidence une diminution significative de ce paramètre chez les rats EX, quel que soit le type d'effort, comparé aux rats DV sédentaires (Figure 5C).

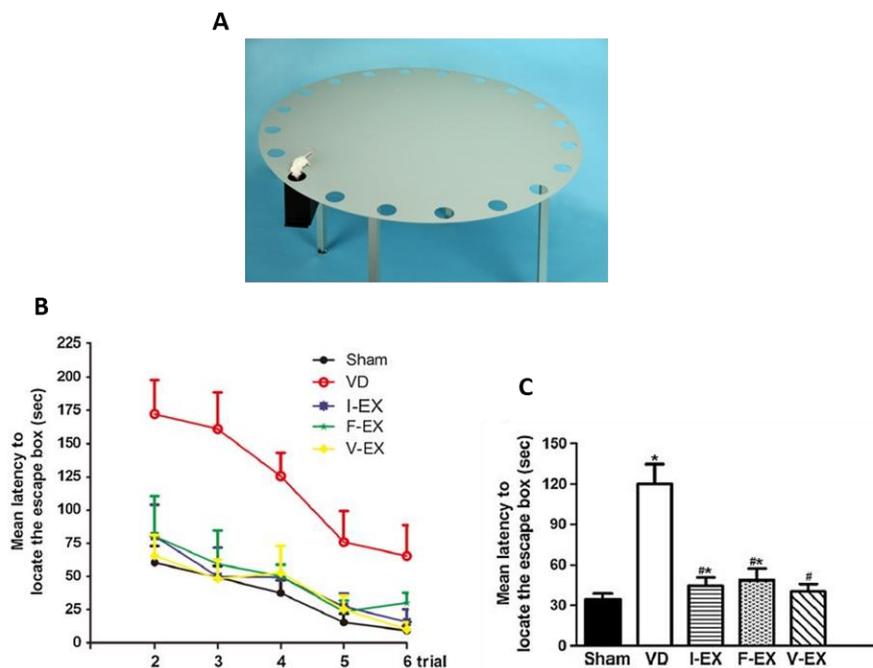


Figure 5 : Effet de différents types d'EX sur le temps de fuite de l'animal évalué par le test du labyrinthe de Barnes.

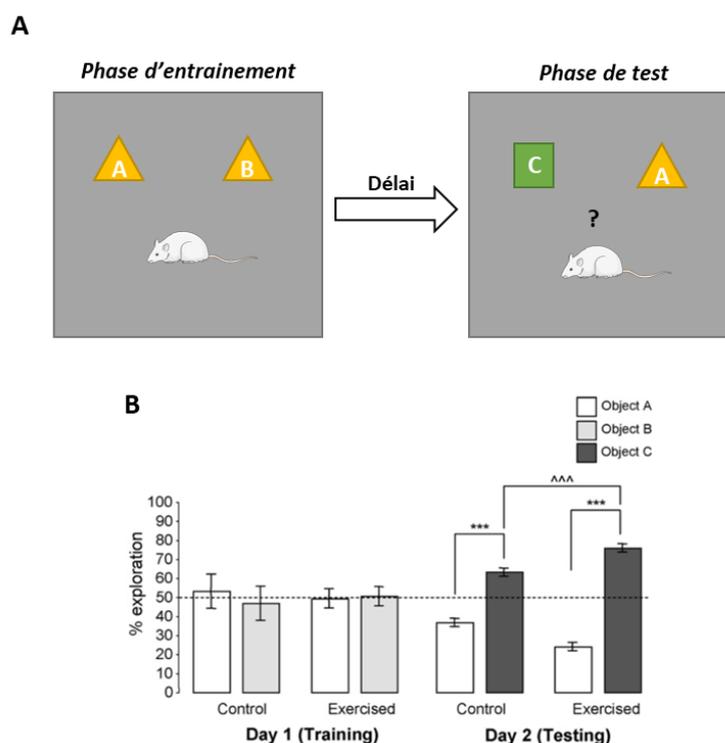
Représentation du labyrinthe de Barnes (A). Le temps de latence pour trouver l'échappatoire à chaque essai est représenté dans le graphe B. Le graphe C compare la moyenne des temps de latence obtenus par essai pour chaque groupe. Sham = contrôle, VD = rats sédentaires à démence vasculaire, I-EX = rats VD soumis à un EX involontaire, F-EX = rats VD soumis à un EX forcé, V-EX = rats VD soumis à un EX volontaire. \* $p < 0.05$  comparé au groupe Sham, # $p < 0.05$  comparé au groupe VD. D'après Lin *et al.* (2015).

### c. Le test de reconnaissance d'objet (Novel object recognition test, NORT)

Créé par Ennaceur et Delacour en 1988 (Ennaceur *et al.* 1988), le test de reconnaissance d'objet permet d'évaluer l'apprentissage et la mémoire de reconnaissance en se basant sur la tendance naturelle des rongeurs à explorer la nouveauté. Il se déroule principalement en 3

<sup>11</sup> Le modèle de démence vasculaire a été généré par une occlusion permanente des deux artères carotidiennes communes.

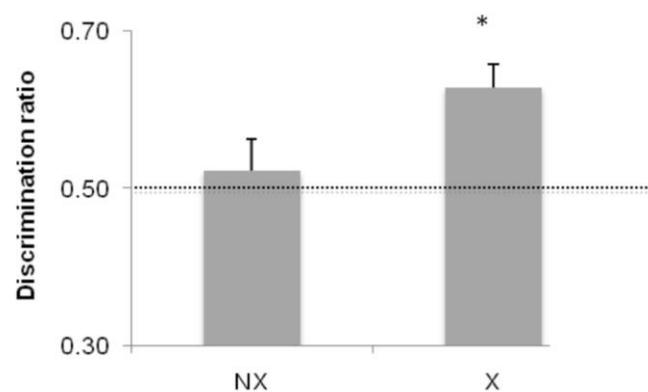
phases (Figure 6A). La première phase consiste à habituer l'animal à l'environnement du test, afin de limiter le stress engendré par un nouvel environnement. La seconde phase, dite « d'entraînement », se déroule en présence de deux objets identiques et peut être répétée plusieurs fois pour renforcer l'apprentissage. Enfin, la troisième phase correspond à la phase de test, durant laquelle l'animal est mis en présence cette fois-ci de l'objet familier (objet de la phase d'entraînement) et d'un nouvel objet. Les travaux d'O'Callaghan *et al.* (2007) ont été les premiers à mettre en évidence un effet de l'EX sur la mémoire de reconnaissance chez le rongeur. Comme illustré dans la figure 6, le pourcentage d'exploration du nouvel objet (C) est significativement plus élevé chez les rats soumis à un EX imposé (EX pendant 7 jours, 60 min à 1 km/h) comparé aux rats SED (Figure 6B).



**Figure 6 : Effet d'un EX imposé sur la mémoire de reconnaissance chez le rat évaluée par le test de reconnaissance d'objet.**

Représentation schématique du test de reconnaissance d'objet (A). Les objets A et B correspondent aux objets identiques présentés à l'animal lors de la phase d'entraînement (Day 1, Training) du test. L'objet C désigne l'objet nouveau placé en présence de l'objet A (familier) lors de la phase de test (Day 2, Testing). (B) Lors de la phase de training, le % d'exploration des objets A et B est similaire en cas d'EX. lors de la phase de testing, l'EX augmente significativement le % d'exploration de l'objet C comparé à l'objet A. (ANOVA one-way,  $p < 0.001$ ;  $F(3,19) = 150.24$ ). D'après O'Callaghan *et al.* (2007).

Enfin, comme décrit dans la figure 7, lorsque l'EX est pratiqué librement dans une roue pendant 4 semaines, la discrimination entre l'objet nouveau et l'objet familier est statistiquement plus importante chez le groupe EX (noté X) que le groupe non exercé (noté NX) (Hopkins *et al.* 2010). Pour exemple, d'autres équipes ont également eu recours au NORT afin d'évaluer l'impact de l'EX sur la plasticité cérébrale (Garcia-Capdevila *et al.* 2009; Griffin *et al.* 2009; Costa *et al.* 2012; Bechara *et al.* 2013). A noter que j'ai été chargée durant ma thèse de la mise au point du NORT au laboratoire, le protocole étant décrit dans la partie 2A du manuscrit.



**Figure 7 : Impact d'un EX volontaire chez le rat sur la mémoire de reconnaissance.**

Mesure du ratio de discrimination de l'objet familier de l'objet nouveau entre les rats NX = rats non exercés, et les rats X = rats exercés dans une roue. Augmentation significative du ratio pour le groupe X. \* $p < 0.05$  comparé au groupe NX,  $n = 16$  rats/groupe. D'après Hopkins *et al.* (2010).

#### **d. Le test du labyrinthe à bras radial (Radial arm maze test)**

Conçu par Olton et Samuelson en 1976 afin d'évaluer l'apprentissage et la mémoire spatiale, le test du labyrinthe à bras radial est composé d'une plateforme centrale surélevée d'un mètre et 8 bras rayonnant autour de cette dernière (Figure 8A). Chaque bras comporte une porte qui peut être franchie avec la présence de nourriture ou d'eau à son extrémité. L'animal doit apprendre à entrer une seule fois dans chaque bras pour trouver la nourriture ou l'eau. Le temps passé à chercher l'eau ou la nourriture dans les bras et le nombre d'erreurs des bras visités sont comptabilisés. Ce test nécessite de faire jeûner l'animal 24h avant sa réalisation. A titre d'exemple, les travaux de Kim *et al.* (2010) étudient l'effet d'un EX imposé de 30 min pendant 6 semaines, d'intensité faible (5 min à 2 m/min, 5 min à 5 m/min, et 8 m/min pendant 20 min) chez des rats jeunes comparés à des rats âgés (24 mois) (Figure 8). Les

données montrent que l'EX n'impacte pas significativement la mémoire spatiale des jeunes rats (Figure 8B et C). Néanmoins, une diminution significative du temps pour retrouver l'eau et le nombre d'erreur est constatée chez les rats âgés soumis à l'EX, comparés aux rats âgés contrôles. D'autres auteurs ont également rapporté des effets positifs de l'EX sur la mémoire, notamment chez la souris ayant un accès libre à une roue (Anderson *et al.* 2000; Berchtold *et al.* 2010).

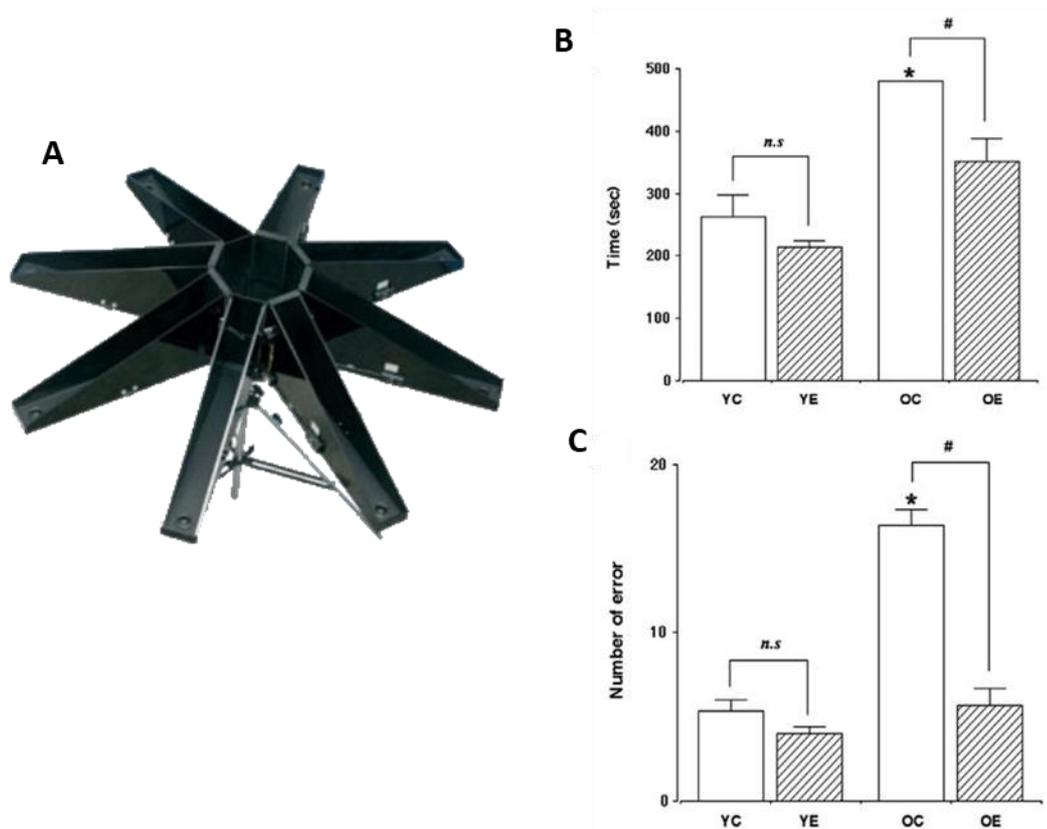


Figure 8 : Effet d'un EX imposé sur la mémoire spatiale évaluée par le labyrinthe à bras radial.

Représentation du labyrinthe à 8 bras radial (A). Les graphes B et C représentent respectivement le temps pour trouver l'eau dans les bras et le nombre d'erreurs effectuées avant de trouver l'eau. Un effet de l'EX est seulement observé chez les rats âgés exercés comparés aux rats âgés sédentaires. YC = groupe jeune contrôle, YE = groupe jeune exercé, OC = groupe âgé contrôle, OE = groupe âgé exercé. n = 10 rats/groupe. \*p < 0.05 comparé aux valeurs du groupe YC et #p < 0.05 comparé à chaque groupe contrôle, n.s = non significatif. D'après Kim *et al.* (2010).

## B. Le Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)

### 1. Description générale

Isolé et purifié à partir de cerveaux porcins par l'équipe de Barde et ses collaborateurs (Barde *et al.* 1982), le BDNF est une neurotrophine appartenant à la famille des facteurs de croissance qui compte le nerve growth factor (NGF) et les neurotrophines 3 (NT3), 4 (NT4) et 5 (NT5). Ce peptide exerce ses fonctions biologiques par sa fixation spécifique aux récepteurs tropomyosine related kinase B (TrkB). Il est également capable de se fixer sur les récepteurs pan 75 (p75) mais avec une moindre affinité par rapport à sa forme précurseur, le proBDNF (Roux *et al.* 2002; Chao 2003). Le récepteur p75, associé aux voies de signalisation apoptotiques sera peu développé dans cette thèse alors que les récepteurs TrkB seront présentés de façon plus détaillée.

Bien qu'initialement découvert au niveau cérébral, le BDNF a également été retrouvé dans de nombreux autres tissus périphériques. Les travaux menés au niveau cérébral rapportent un rôle positif au cours du neuro-développement mais surtout un rôle clé dans les mécanismes neuroplastiques chez l'adulte. A la périphérie, les études sont peu nombreuses mais décrivent notamment un rôle vasodilatateur et une implication dans la myogenèse du muscle squelettique. Son métabolisme, son mécanisme d'action, sa localisation et ses rôles sont développés dans les paragraphes suivants.

### 2. Métabolisme

Le gène *bdnf* a été cartographié sur les chromosomes 11, 2 et 3 chez l'Homme, la Souris et le Rat, respectivement (Ozcelik *et al.* 1991). Sa synthèse neuronale est bien décrite dans la littérature et débute comme tout peptide, par sa transcription en ARN messagers (ARNm), qui sont traduits au niveau du réticulum endoplasmique rugueux par les ribosomes, en un premier précurseur de haut poids moléculaire, le pré-proBDNF, constitué d'une séquence signale, d'un pro-domaine et d'une séquence mature (Figure 9). Ce dernier est subséquentement clivé en proBDNF (35 kDa) et s'accumule ensuite dans les vésicules du réseau transgolgien pour être clivé ou non en BDNF mature (14-15 kDa).



Figure 9 : Schéma des séquences des différents domaines constituant la protéine BDNF.

La séquence totale contient 249 acides aminés (aa), le pré-domaine : 18 aa, le pro-domaine : 112 aa et le BDNF mature : 119 aa.

Le métabolisme du BDNF et ses voies de sécrétions sont résumés dans la figure 10. De façon plus détaillée, le BDNF peut être libéré dans l'espace extracellulaire soit par la voie de sécrétion régulée, impliquant le  $\text{Ca}^{2+}$  et les protéines proconvertases 1/7, soit par la voie de sécrétion constitutive (sécrétion permanente non régulée) impliquant la furine (Mowla *et al.* 1999; Mowla *et al.* 2001). Par ailleurs, des données suggèrent une sécrétion neuronale du proBDNF (Lu *et al.* 2005) avec un clivage de ce dernier en BDNF par les métalloprotéinases matricielles et la plasmine (Pang *et al.* 2004), mais ces données sont sujettes à controverse (Matsumoto *et al.* 2008; Barker 2009). Malgré tout, le clivage extracellulaire du proBDNF apparaît nécessaire pour l'induction de la LTP alors que son clivage intracellulaire interviendrait uniquement dans le maintien de cette dernière (Pang *et al.* 2016).

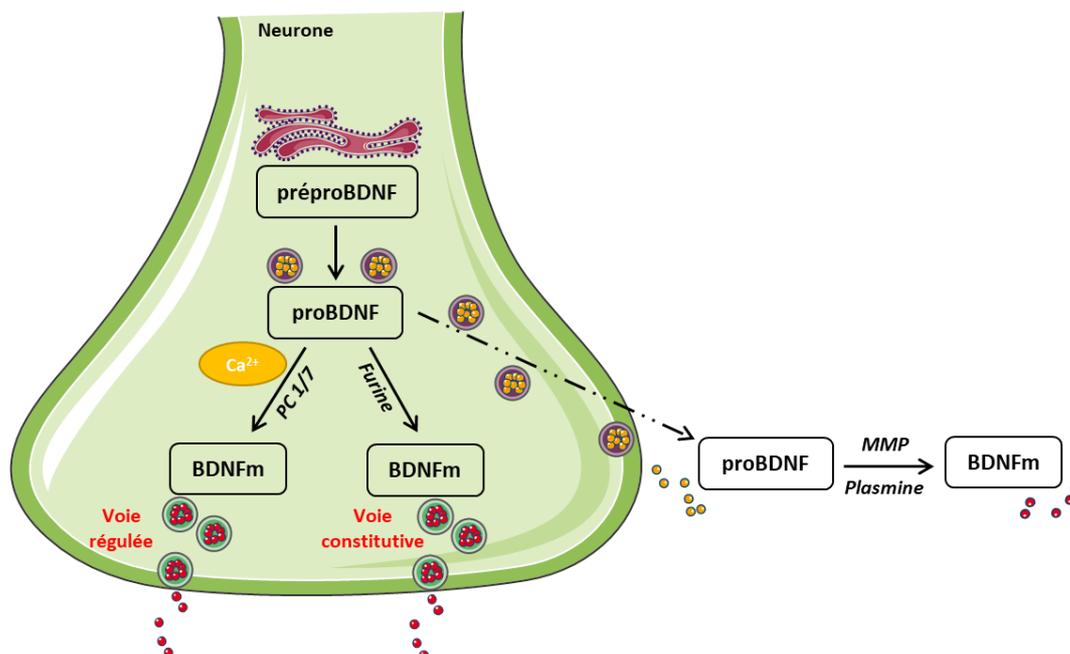


Figure 10 : Métabolisme du BDNF neuronal et mécanismes impliqués dans le clivage du proBDNF en BDNF.

PC = pro protéines convertases 1/7, MMP = métalloprotéinases matricielles.

### a. Les transcrits BDNF

Dans la littérature, l'étude du gène *bdnf* a révélé l'existence d'une variété de transcrits retrouvés à la fois chez l'Homme, la Souris et le Rat (Maisonpierre *et al.* 1991; Metsis *et al.* 1993; Timmusk, Palm, *et al.* 1993; Timmusk *et al.* 1995; Aid *et al.* 2007). Les premiers travaux de Timmusk, Palm, *et al.* (1993) identifient quatre transcrits *bdnf* chez le rat, conduisant chacun à la transcription des ARNm contenant un des quatre exons 5' non codants (notés I à IV) couplé à l'exon 3' commun codant pour la protéine (noté V). En 2007, une nouvelle nomenclature des exons *bdnf* est proposée par Aid *et al.* (2007) témoignant alors de la complexité structurale du gène *bdnf*. En effet, le gène *bdnf* contiendrait, non pas quatre mais plus de huit exons 5' non traduits associés à l'exon 3' commun codant pour la protéine BDNF. Les exons III, IV et V décrits par Timmusk deviennent respectivement les exons IV, VI, et IX dans la nouvelle nomenclature d'Aid. Bien qu'exprimés de manière différentielle dans le cerveau et dans les tissus périphériques (Liu *et al.* 2006; Aid *et al.* 2007), ces transcrits dans leur ensemble aboutissent à terme, à la forme bioactive du BDNF. Les nomenclatures des auteurs Timmusk et Aid sont résumées dans la figure 11.

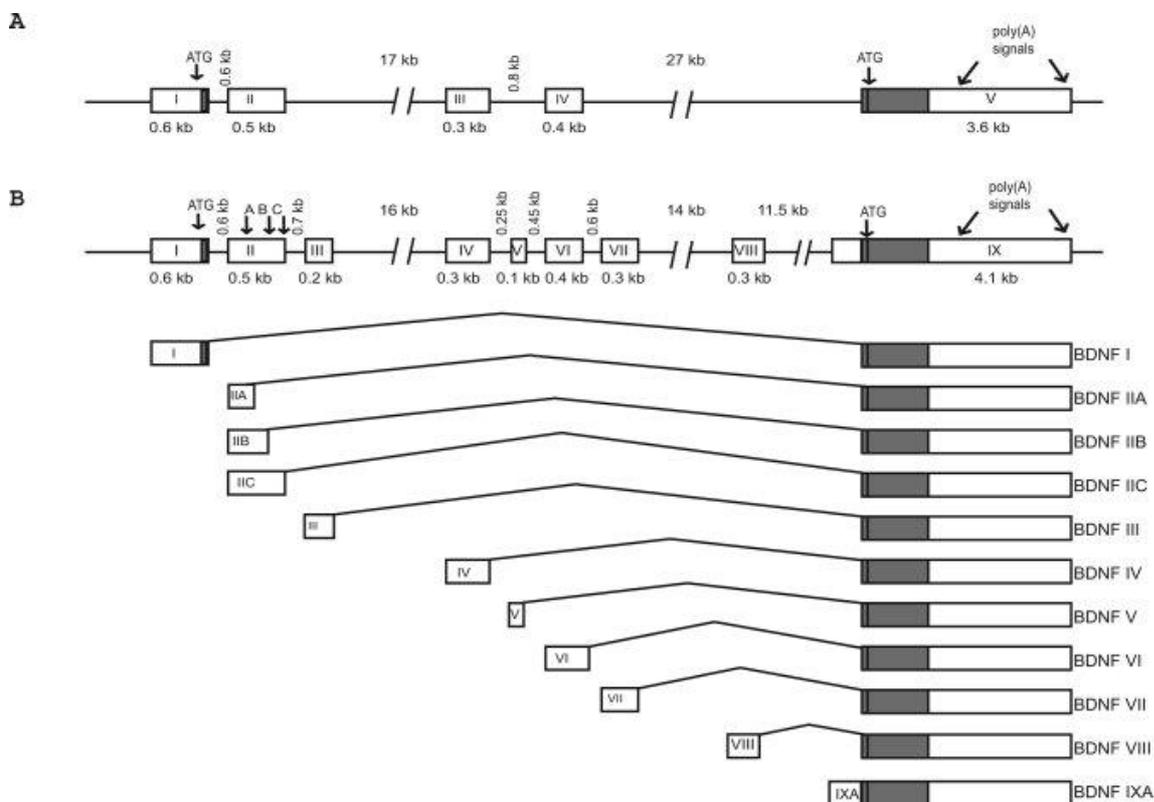


Figure 11 : Représentation des transcrits *bdnf* selon les nomenclatures de Timmusk et Aid.

A. Structure du gène *bdnf* chez le rat d'après Timmusk 1993, avec les quatre exons notés I, II, III, IV.  
 B. Nouvelle représentation du gène *bdnf* chez le rat et la souris avec ces 11 exons. D'après Aid *et al.* (2007).

### b. Le polymorphisme Val66Met

Chez l'Homme, le gène *bdnf* est sujet à un polymorphisme fonctionnel assez fréquent dans la population caucasienne (environ 30%). Il se traduit au niveau du codon 66 par la substitution d'une valine par une méthionine, d'où son appellation, polymorphisme Val66Met. Il est associé à une moindre sécrétion régulée de BDNF, un défaut de mémoire épisodique, une réduction du volume de l'hippocampe (Egan *et al.* 2003; Hariri *et al.* 2003; Chen *et al.* 2004) et semble prédisposer les sujets porteurs de ce polymorphisme au déclin cognitif associé à l'âge, au développement de maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson) (Kunugi *et al.* 2001; Momose *et al.* 2002; Ventriglia *et al.* 2002; Egan *et al.* 2003) ou à des troubles de l'humeur comme la dépression (Lee *et al.* 2013; Youssef *et al.* 2018).

### c. Régulation de l'expression du BDNF

Au niveau cérébral, la synthèse de BDNF est régulée en partie par l'activité neuronale (Zafra *et al.* 1990; Lindholm *et al.* 1994; Palomer *et al.* 2016) et l'influx calcique médié par les récepteurs NMDA et les canaux calciques voltages dépendants, les L-VGCC (L-voltage-gated calcium channel) (Tabuchi *et al.* 2000; West *et al.* 2001; Mellstrom *et al.* 2004; Zheng *et al.* 2011). Parmi les transcrits de BDNF, l'exon IV a suscité plus d'attention, puisqu'il est la forme induite majoritairement par l'activité des neurones corticaux (Tao *et al.* 1998; Zheng *et al.* 2011). Dans des cultures de neurones, l'influx calcique permet d'augmenter les ARNm codant pour le BDNF (Tao *et al.* 1998; Tabuchi *et al.* 2000; Zheng *et al.* 2011). *In vivo*, des stratégies visant à augmenter l'activité neuronale, telles que l'exposition chronique à des drogues (Wang *et al.* 2010), l'EX (Neeper *et al.* 1995) ou encore le conditionnement de peur (Lubin *et al.* 2008; Fuchikami *et al.* 2010) conduisent à une augmentation des transcrits BDNF au niveau cérébral. Les neurotransmetteurs, comme le GABA (inhibiteur) et le glutamate (excitateur), contrôlent également les taux de messagers BDNF en régulant l'expression soit à la baisse, soit à la hausse, respectivement (Zafra *et al.* 1990). Au niveau moléculaire, de nombreux facteurs de transcription tels que la protéine CREB (cAMP Response Element Binding) et son co-activateur, le CBP (CREB-binding protein) (Tao *et al.* 1998; West *et al.* 2001), les USF1/2 (Upstream Stimulatory Factors 1/2) (Shieh *et al.* 1999; Tabuchi *et al.* 2002) et les CaRF (Calcium Responsive transcription Factor) (Tao *et al.* 2002; Zheng *et al.* 2011) participent à la régulation de la synthèse de BDNF. La transcription du BDNF est également sous le contrôle de mécanismes

épigénétiques<sup>12</sup> comme le remodelage de la chromatine par méthylation de l'ADN<sup>13</sup> ou la désacétylation des histones<sup>14</sup>. Ainsi, une hyperméthylation de l'ADN est associée à une réduction de la transcription du BDNF alors que l'inhibition de l'activité des histones désacétylases (HDAC) engendre une augmentation de l'expression des transcrits (Ishimaru *et al.* 2010).

### 3. Mécanismes d'action

Sous sa forme mature (bioactive), le BDNF va exercer ses effets biologiques par sa fixation spécifique sur le récepteur TrkB. Comme toutes les neurotrophines (NGF, NT3/4/5), il peut également se lier au récepteur p75, une glycoprotéine transmembranaire, mais avec une moindre affinité pour celui-ci (Chao 2003). C'est la forme précurseur du BDNF, le proBDNF, qui présente une forte affinité pour le récepteur p75 couplé à la sortiline, co-récepteur indispensable se liant au pro-domaine du BDNF (Chen, Ieraci, *et al.* 2005). Même si les effets du proBDNF restent à démontrer *in vivo*, les études *in vitro* ont mis en évidence son implication dans l'induction des voies apoptotiques, dans la dépression synaptique à long terme<sup>15</sup> (LTD) et dans la régulation négative de la densité des épines dendritiques dans l'hippocampe (Teng *et al.* 2005; Woo *et al.* 2005; Yang *et al.* 2014). Ayant caractérisé uniquement l'expression du récepteur TrkB, seul celui-ci sera développé ci-dessous.

#### a. Les Récepteurs TrkB et voies de signalisation intracellulaire

Le récepteur TrkB est une protéine transmembranaire, glycosylée qui appartient à la famille des récepteurs à activité tyrosine kinase. Il est constitué de trois domaines (Reichardt 2006), qui sont schématisés dans la figure 12 :

- Un domaine extracellulaire qui se présente sous forme de deux domaines riches en cystéine entre lesquels sont intercalés trois domaines riches en leucine suivis de deux domaines de types immunoglobulines,

---

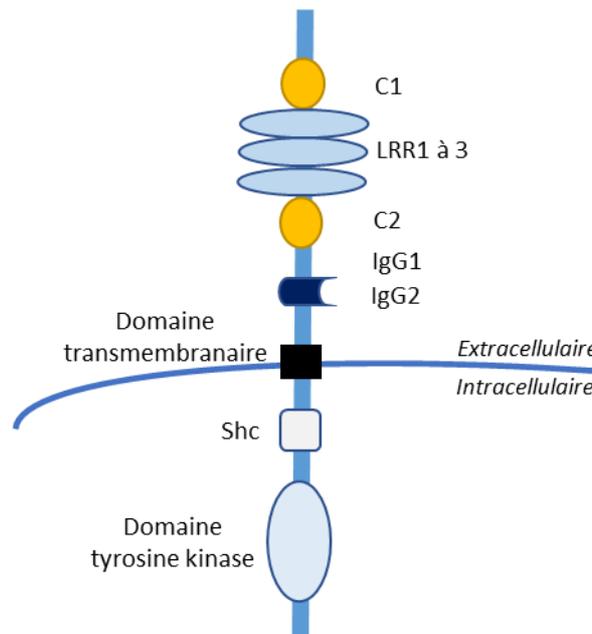
<sup>12</sup> Facteurs modifiant de manière réversible, transmissible et adaptative l'expression des gènes sans en changer la séquence nucléotidique.

<sup>13</sup> Ajout d'un groupement méthyle au niveau d'une cytosine présente dans un dinucléotide CpG. Cette réaction peut inhiber l'expression génétique d'un brin d'ADN.

<sup>14</sup> Les histones sont des protéines nucléaires s'associant à l'ADN pour le compacter et former la chromatine. La désacétylation des histones correspond la perte d'un groupement acétyle sur la partie N-terminale d'une histone.

<sup>15</sup> Opposée à la LTP, la LTD est produite par des influx nerveux de basse fréquence. Ce processus diminue l'efficacité des synapses.

- Un domaine transmembranaire,
- Un domaine cytoplasmique composé d'un site de fixation de la protéine adaptatrice Shc (Src homology 2 domain containing transforming protein), et une région tyrosine kinase.



**Figure 12 : Structure du récepteur TrkB.**

C1, C2 = domaines riches en cystéine - LRR1,2,3 = trois répétitions riches en leucine - IgG1,2 = immunoglobuline G. D'après Reichardt (2006).

Ce récepteur peut être retrouvé sous une forme entière dite « Full length » (TrkB-FL) qui présente un domaine catalytique. Il s'agit de la configuration classique et fonctionnelle du récepteur TrkB. La fixation du BDNF conduit à la dimérisation et l'autophosphorylation des résidus tyrosines du domaine cytoplasmique du récepteur, conduisant alors à son activation. Des protéines adaptatrices sont ensuite recrutées pour déclencher trois voies de signalisations intracellulaires majeures :

- La voie des PI3-kinases (Pi3K/Akt), régulant la transcription des gènes impliqués dans la survie cellulaire et la croissance neuronale,
- La voie de la phospholipase C gamma 1 (PLC $\gamma$ 1), jouant un rôle dans la plasticité synaptique, la transmission neuronale et la survie cellulaire,

- La voie des MAP kinases (Mitogen-activated protein kinases), mise en jeu dans la transcription de gènes essentiels à la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire par l'activation et la translocation du facteur de transcription CREB.

Les voies de signalisation sont résumées dans la figure 13 (Fenner 2012). Il est à noter que l'activation du récepteur peut être caractérisée par l'étude de sa forme phosphorylée.

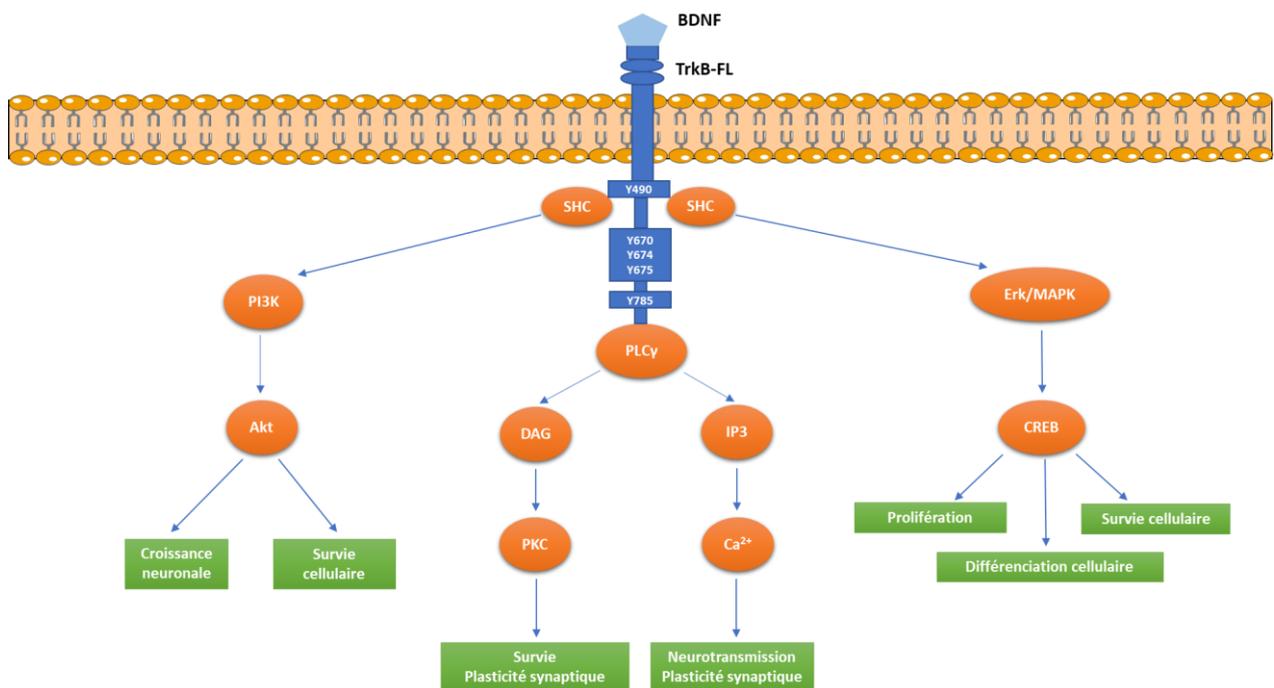


Figure 13 : Voies de signalisation induites par la fixation du BDNF sur le récepteur TrkB-FL. D'après Fenner (2012).

Le récepteur TrkB peut également être retrouvé sous forme tronquée, TrkB-T1 et TrkB-T2. Ces isoformes sont générées à partir de l'épissage alternatif et tronquées au niveau de l'extrémité C-terminale (Eide *et al.* 1996), le domaine tyrosine kinase n'étant alors pas fonctionnel, expliquant l'absence d'activité catalytique (Klein *et al.* 1990; Stoilov *et al.* 2002). Les formes tronquées se distinguent par leur composition en acides aminés au niveau de l'extrémité terminale, la forme TrkB-T1 ne possédant plus de domaine de liaison à la protéine Shc, contrairement à TrkB-T2. Les rôles de ces récepteurs sont encore discutés, mais d'après la littérature, la fixation du BDNF sur ces formes tronquées pourrait conduire à son internalisation (Bartkowska *et al.* 2010). Les formes tronquées pourraient également jouer le rôle de récepteur à dominant-négatif (Fenner 2012) en inhibant l'autophosphorylation des récepteurs TrkB-FL (Wong *et al.* 2012) et les voies de signalisations intracellulaires, par la formation d'un

hétérodimère avec celui-ci (Eide *et al.* 1996; Stoilov *et al.* 2002). Enfin, il semblerait que la forme T1 puisse réguler à la fois la morphologie des astrocytes et l'influx calcique (Ohira *et al.* 2007; Ohira *et al.* 2009), par la voie de signalisation Rho GDI1 (Ohira *et al.* 2005) au niveau cérébral. A la périphérie, la forme T1 serait impliquée dans le maintien de la morphologie des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) (Otani *et al.* 2015).

#### **b. Localisation des isoformes TrkB**

Au niveau cérébral, les récepteurs TrkB-FL ont été retrouvés dans de multiples structures telles que le cortex, l'hippocampe, le cervelet, le striatum, le thalamus, et l'hypothalamus (Drake *et al.* 1999; Ohira *et al.* 1999; Luberg *et al.* 2010; Otani *et al.* 2017) avec pour source cellulaire, les neurones, les cellules gliales (Zhou *et al.* 1993; Yan, Radeke, *et al.* 1997) et les CE (Pedard *et al.* 2017). A la périphérie, il est également présent dans le cœur et les vaisseaux (Stoilov *et al.* 2002; Otani *et al.* 2017) dont les sources cellulaires sont les cardiomyocytes (Kim *et al.* 2004; Fenner 2012; Okada *et al.* 2012), les CE (Bai *et al.* 2014; Pedard *et al.* 2018; Totoson *et al.* 2018) et les CMLV (Donovan *et al.* 1995).

Concernant les isoformes tronquées, la forme TrkB-T1 est majoritairement exprimée dans le cerveau notamment par les neurones (Armanini *et al.* 1995; Ohira *et al.* 1999), les cellules gliales (Armanini *et al.* 1995; Silhol *et al.* 2005) et les cellules endothéliales cérébrales (CEC) (Bai *et al.* 2014; Pedard *et al.* 2018; Totoson *et al.* 2018). A la périphérie, les TrkB-T1 sont présents dans le pancréas, le cœur, les poumons, les muscles squelettiques et les CMLV (Stoilov *et al.* 2002; Otani *et al.* 2015). La forme TrkB-T2 est quant à elle, exclusivement exprimée par le neurone au niveau cérébral (Stoilov *et al.* 2002), et faiblement exprimée par les CE cardiaques à la périphérie (Bai *et al.* 2014).

### **4. Localisation tissulaire**

#### **a. Localisation cérébrale**

Comme son nom l'indique, le BDNF a initialement été découvert dans le cerveau. Les premiers travaux menés dans les années 90 ont caractérisé le BDNF grâce à la technique d'hybridation *in situ*, permettant de localiser les ARNm sur une coupe histologique d'un tissu. Ainsi, les études pionnières menées sur la distribution cérébrale des ARNm BDNF chez le rongeur, révèlent que le cortex et l'hippocampe, sont les structures les plus riches en transcrits

(Ernfors, Ibanez, *et al.* 1990; Hofer *et al.* 1990; Schmidt-Kastner *et al.* 1996). En outre, ils ont également été retrouvés dans le cervelet, les bulbes olfactifs, le tronc cérébral et la moelle épinière (Ernfors, Ibanez, *et al.* 1990; Hofer *et al.* 1990).

Par la suite, les études sur l'expression protéique de BDNF sont apparues après la mise sur le marché d'anticorps dirigés spécifiquement contre cette protéine. Néanmoins, ces anticorps reconnaissent à la fois les formes précurseur et mature du BDNF, ne permettant pas par analyse immunohistochimique ou par dosage de type ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) de les discriminer. Malgré tout, l'utilisation de ces techniques a montré que les structures riches en messagers BDNF étaient également riches en protéines BDNF. Quant aux régions dépourvues d'ARNm BDNF, comme le thalamus, la substance noire, le septum latéral et le striatum, des taux protéiques de BDNF ont été détectés (Kawamoto *et al.* 1996; Yan, Rosenfeld, *et al.* 1997; Kawamoto *et al.* 1999) supportant le concept d'un transport axonal antérograde du BDNF vers ces structures (Altar *et al.* 1997; Conner *et al.* 1997; Altar *et al.* 1998; Conner *et al.* 1998). Plus récemment, la technique de Western Blotting (WB), séparant les protéines en fonction de leur masse moléculaire, a permis de distinguer la forme mature de la forme précurseur du BDNF, confirmant alors une expression cérébrale de la protéine BDNF avec des taux particulièrement élevés dans l'hippocampe et le cortex cérébral (Costa *et al.* 2012; Quirie *et al.* 2012; Monnier, Garnier, *et al.* 2017; Cefis *et al.* 2019).

#### **b. Localisation périphérique**

Comme évoqué précédemment, le BDNF a été mis en évidence dans de nombreux tissus périphériques, notamment au niveau du système cardiovasculaire (Timmusk, Belluardo, *et al.* 1993; Meuchel *et al.* 2011; Amoureux *et al.* 2012), à savoir le cœur et les vaisseaux de résistance<sup>16</sup> et de conductance<sup>17</sup> (Quirie *et al.* 2012; Prigent-Tessier *et al.* 2013; Bai *et al.* 2014; Pedard *et al.* 2018; Totoson *et al.* 2018). A cet égard, notre laboratoire a montré *in vivo*, que le cœur et l'aorte présentaient des taux protéiques de BDNF comparables à ceux retrouvés dans l'hippocampe, la structure cérébrale présentant les taux de BDNF les plus élevés (Prigent-Tessier *et al.* 2013). D'autre part, le gène et la protéine BDNF ont également été détectés dans les poumons (Ricci *et al.* 2004; Aid *et al.* 2007), le thymus (Laurenzi *et al.* 1994; Aid *et al.* 2007),

---

<sup>16</sup> Les vaisseaux de résistance sont des vaisseaux de petits calibres impliqués dans le contrôle de l'apport sanguin aux organes.

<sup>17</sup> Les vaisseaux de conductance sont des vaisseaux de gros calibres présents à l'extérieur des organes, conduisant le sang sans contrôler son apport.

la rate (Laurenzi *et al.* 1994; Yamamoto *et al.* 1996; Aid *et al.* 2007), la rétine (Perez *et al.* 1995) et le muscle squelettique (Griesbeck *et al.* 1995).

Enfin, les travaux de Rosenfeld *et al.* (1995), révèlent la présence de BDNF dans le sang, avec des taux sériques nettement plus importants que ceux retrouvés dans le plasma. Cette disparité pourrait s'expliquer par une forte expression du BDNF par les plaquettes (Yamamoto *et al.* 1990; Fujimura *et al.* 2002) et ses progéniteurs, les mégacaryocytes (Chacon-Fernandez *et al.* 2016). En effet, des études menées chez le rat (absence de BDNF circulant chez la souris (Klein *et al.* 2011)) et l'humain ont montré une expression et une accumulation importante du gène et de la protéine BDNF dans les granules  $\alpha$  des mégacaryocytes (Chacon-Fernandez *et al.* 2016). Cette réserve pourrait ensuite être transmise aux plaquettes qui bien que dépourvues de noyaux, sont aussi capables de capter, stocker et relarguer du BDNF en cas d'épisode d'agrégation plaquettaire ou en réponse aux forces de cisaillements exercées par le sang sur l'endothélium (terme anglais, shear stress, SS)<sup>18</sup>. Sa présence au niveau sanguin soulève une question concernant son origine, qui pourrait être à la fois périphérique et/ou cérébrale. Même si les études sont encore contradictoires quant au passage possible du BDNF à travers la barrière hémato encéphalique (BHE), des travaux suggèrent que le BDNF circulant pourrait avoir une origine cérébrale (Karege *et al.* 2002; Klein *et al.* 2011; Munkholm *et al.* 2014; Cattaneo *et al.* 2016) comme le laissent supposer les études de Rasmussen et Seifert démontrant une concentration en BDNF plus élevée dans le sang prélevé au niveau de la veine jugulaire que celle de l'artère brachiale, tant en condition de repos qu'après un EX (Rasmussen *et al.* 2009; Seifert *et al.* 2010).

## 5. Les sources cellulaires de BDNF

### a. Le cerveau

#### *Le neurone*

Défini comme l'unité fonctionnelle du système nerveux, le neurone est une cellule présentant la caractéristique d'être à la fois excitable et sécrétrice. Après la découverte du BDNF en 1982, de nombreuses études utilisant la technique d'hybridation *in situ* ont caractérisé

---

<sup>18</sup> Le shear stress correspond à la force tangentielle provenant du frottement du sang sur la surface de l'endothélium. Il est proportionnel au débit sanguin et inversement proportionnel au rayon du vaisseau. Le SS représente le stimulus mécanique de la production de NO par le vaisseau.

le neurone comme la source principale en ARNm BDNF (Ernfors, Wetmore, *et al.* 1990; Phillips *et al.* 1990; Wetmore *et al.* 1990; Ceccatelli *et al.* 1991). Ce n'est que plus tard que l'expression protéique de BDNF par les neurones du système nerveux central (SNC) a été démontrée (Dugich-Djordjevic *et al.* 1995; Conner *et al.* 1997; Yan, Rosenfeld, *et al.* 1997).

Au cours du développement du SNC (Maisonpierre *et al.* 1990; Katoh-Semba *et al.* 1997; Ip *et al.* 2001; Kim *et al.* 2007), le BDNF est à peine détectable au stade embryonnaire comme en témoigne l'analyse structurale du développement du cerveau, de la moelle épinière et du cervelet. Parmi les neurotrophines, alors que le BDNF ne semble intervenir pleinement qu'après la naissance, la NT-3 jouerait un rôle clé durant le développement embryonnaire (Maisonpierre *et al.* 1990). Après la naissance, les taux d'ARNm BDNF augmentent progressivement, notamment dans les régions du SNC où la neurogenèse est déjà mise en place. Par analyse immunohistochimique, réalisée à différents stades postnataux (1, 7, 14 et 28 jours) (Kim *et al.* 2007), l'expression de BDNF apparaît dès le 1<sup>er</sup> jour dans l'hypothalamus et la substance noire. Ce n'est qu'à partir du 7<sup>e</sup> jour que son expression est détectée dans l'hippocampe, le cortex cérébral, le thalamus et l'amygdale chez le rat. De façon étonnante, cette expression précoce de BDNF est absente à l'âge adulte dans l'hypothalamus et la substance noire (Kim *et al.* 2007), alors que les expressions dans les autres structures ne cessent d'augmenter pendant le développement jusqu'à l'âge adulte (Maisonpierre *et al.* 1990; Kim *et al.* 2007).

### ***Les autres types cellulaires***

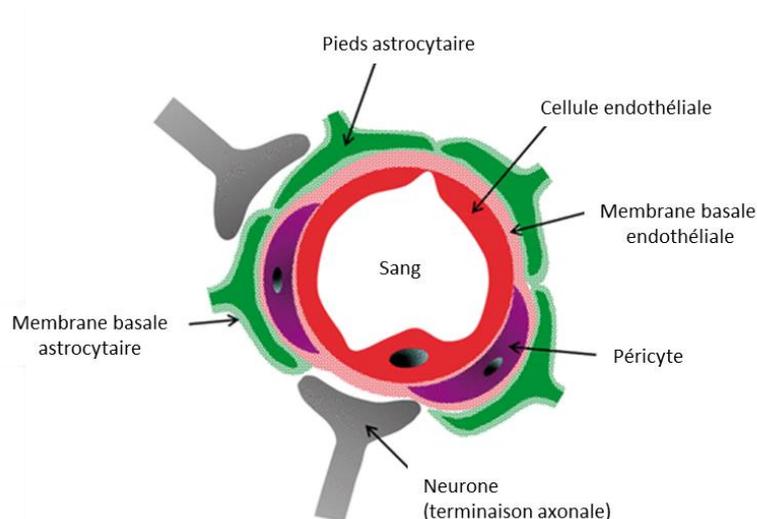
Particulièrement riche en neurones, le cerveau présente également une proportion importante de cellules gliales qui contrôlent l'environnement des neurones en assurant le maintien de l'homéostasie. Quatre populations de cellules gliales sont retrouvées dans le SNC et le système nerveux périphérique (SNP) :

- Les astrocytes et les oligodendrocytes localisés au niveau du SNC,
- Les cellules de Schwann localisées au niveau du SNP,
- La microglie, reconnue comme les macrophages du cerveau et de la moelle épinière.

Parmi ces populations gliales, les études *in vitro* et *in vivo* révèlent que l'expression de BDNF par les oligodendrocytes (Dougherty *et al.* 2000; Dai *et al.* 2003), les astrocytes (Sato *et al.* 2009; Uchida *et al.* 2010) ou encore la microglie (Elkabes *et al.* 1996; Dougherty *et al.* 2000; Madinier

*et al.* 2009) est principalement abondante en cas de pathologies telles que l'ischémie cérébrale (Madinier *et al.* 2009; Bejot *et al.* 2011; Quirie *et al.* 2012), une lésion de la moelle épinière (Dougherty *et al.* 2000) ou encore en cas de douleurs neuropathiques (Gomes *et al.* 2013). Pour exemple, le BDNF issu de la microglie module l'activité synaptique au niveau de la moelle épinière (Bessis *et al.* 2007) alors que le BDNF libéré par les neurones peut être recyclé par les astrocytes pour intervenir dans la LTP (Vignoli *et al.* 2016). En cas d'ischémie cérébrale chez le singe, la production gliale de BDNF assure la protection et la régénération des fibres nerveuses dans la zone ischémisée (Sato *et al.* 2009). Enfin, en cas de douleurs neuropathiques (Trang *et al.* 2011; Gomes *et al.* 2013) ou d'ischémie cérébrale (Madinier *et al.* 2009), le BDNF interviendrait dans l'activation microgliale.

Par ailleurs, le BDNF est également exprimé par les péricytes (Ishitsuka *et al.* 2012) localisés au niveau de la lame basale de l'endothélium des capillaires et par les CEC tapissant les vaisseaux de petits et gros calibres (Guo *et al.* 2008; Monnier, Prigent-Tessier, *et al.* 2017). De manière générale, les travaux sur la localisation cellulaire du BDNF cérébral rapportent que l'ensemble des cellules formant l'unité neurogliovasculaire (Figure 14) sont en mesure d'exprimer cette neurotrophine.



**Figure 14 : Représentation de l'unité neurogliovasculaire.**

D'après la revue Marie *et al.* (2018).

## Rôles du BDNF cérébral

Afin de déterminer le rôle du BDNF cérébral, plusieurs approches ont été envisagées, allant de l'utilisation de modèles *in vitro* de culture neuronale et de tranches de cerveaux, jusqu'à des modèles *in vivo* avec l'utilisation des animaux génétiquement modifiés.

L'approche génétique via l'utilisation de souris KO pour le gène *bdnf* a d'abord rencontré un frein puisque les souris KO homozygotes ne survivaient qu'à peine 3 semaines (Ernfors *et al.* 1994; Conover *et al.* 1997) soulignant ainsi le rôle déterminant du BDNF dans la survie pré- et post- natale. Les souris KO hétérozygotes quant à elles, sont viables mais présentent une altération de la LTP (Korte *et al.* 1995; Patterson *et al.* 1996), des déficits dans les mécanismes d'apprentissage dépendants de l'hippocampe (Linnarsson *et al.* 1997; Bartoletti *et al.* 2002; Liu *et al.* 2004) et quelques déficits nociceptifs et sensoriels (Korte *et al.* 1995; MacQueen *et al.* 2001). Cette approche suggère que le BDNF participe également aux phénomènes neuroplastiques, mais elle ne permet pas de cibler le type cellulaire à l'origine des effets du BDNF. Comme mentionné précédemment, l'étude du polymorphisme Val66Met associé à une réduction de la mémoire épisodique et à une prédisposition au déclin cognitif associé à l'âge, conforte son implication dans les processus cognitifs.

D'autres stratégies ont aussi été envisagées comme l'injection de BDNF (Keiner *et al.* 2009), d'anticorps anti-BDNF, les utilisations des ARN interférents (Wang *et al.* 2012) et des antagonistes des récepteurs TrkB pour mettre en lumière son rôle au niveau cérébral. En effet, l'incubation de tranches hippocampiques de souris hétérozygotes BDNF<sup>+/-</sup> avec du BDNF recombinant, inverse les déficits en LTP observés initialement chez ces animaux (Patterson *et al.* 1996). En outre, l'administration d'ARN interférents, empêchant la traduction du BDNF, entraîne chez le rat, une diminution de la production hippocampique de BDNF, une réduction de la LTP (Ma *et al.* 1998) et une altération de l'apprentissage dans le labyrinthe à bras radial (Mizuno *et al.* 2000).

En résumé, le BDNF cérébral est impliqué à la fois dans le développement du SNC et principalement dans les processus neuroplastiques chez l'adulte, comme en témoigne les voies de signalisation activées après sa fixation spécifique sur les récepteurs TrkB-FL (Figure 13). A l'étage fonctionnel, celui-ci joue également un rôle dans la régulation de l'humeur (Castren *et al.* 2017), l'apprentissage et la mémoire (Cunha *et al.* 2010), le contrôle de la prise alimentaire (Rosas-Vargas *et al.* 2011). A l'inverse, en cas de douleurs neuropathiques, le BDNF joue un rôle

hyperalgésique en favorisant l'installation et la chronicisation de ce type de douleurs (Groth *et al.* 2002; Siniscalco *et al.* 2011; Trang *et al.* 2011).

### **b. L'endothélium**

L'endothélium vasculaire est une monocouche de CE, qui tapisse l'ensemble des vaisseaux de l'organisme. Cette couche, la plus interne des vaisseaux (intima), est en contact direct avec le sang, la désignant ainsi comme une interface dynamique entre le sang et le vaisseau. L'endothélium vasculaire de la microvasculature cérébrale, c'est-à-dire, des artérioles aux capillaires, est de type BHE avec des jonctions serrées étanches, faiblement perméables à l'eau, le passage des substances non liposolubles nécessitant la présence de transporteurs. Les CEC sont également différentes des CE périphériques, par une proportion plus faible en vésicules de pinocytose et un nombre plus important de mitochondries (Zhao *et al.* 2015). C'est la contraction des péricytes très proches des CEC, qui permet d'adapter le diamètre des capillaires cérébraux qui sont dépourvus de CMLV. La relation étroite entre les microvaisseaux cérébraux et le tissu cérébral représente une véritable structure d'interaction au sein de l'unité neuroglivovasculaire (del Zoppo *et al.* 2003) illustrée dans la figure 14.

Les CE, qu'elles soient périphériques ou cérébrales, sont essentielles pour le développement et le maintien des fonctions vasculaires. Parmi celles-ci, on distingue le tonus vasculaire, la croissance cellulaire, l'inflammation et l'hémostase.

### ***La cellule endothéliale périphérique et cérébrale***

Les travaux de Leventhal (1999) ont été les premiers à mettre en évidence *in vitro* que des CEC humaines et des CE isolées à partir de veine ombilicale humaine (HUVEC) produisent des ARNm BDNF et sont capables de libérer du BDNF sous sa forme bioactive dans le milieu de culture. Cette découverte a ensuite été appuyée par d'autres travaux menés sur des CE en culture à la fois périphériques et cérébrales (Nakahashi *et al.* 2000; Bayas *et al.* 2002; Kallmann *et al.* 2002; Ruprecht *et al.* 2002; Takeo *et al.* 2003). De manière intéressante, il a été rapporté que des cultures primaires de CEC de souris synthétisent 50 fois plus de BDNF que des cultures primaires de neurones corticaux (Guo *et al.* 2008). En condition hypoxique (Kim *et al.* 2004) ou exposées au facteur de nécrose tumorale  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) (Bayas *et al.* 2002; Takeda *et al.* 2013), les CEC répondent par une augmentation des taux de BDNF. A l'inverse, en cas d'exposition des CEC à un stress oxydant ou au peptide Amyloïde  $\beta$  (A $\beta$ ), les taux de BDNF sont diminués (Guo

*et al.* 2008). Par technique d'immunofluorescence, notre laboratoire a confirmé les résultats de la littérature en montrant que les CE de l'aorte et des vaisseaux présents dans le cortex cérébral expriment du BDNF (Prigent-Tessier *et al.* 2013; Monnier, Prigent-Tessier, *et al.* 2017). De manière étonnante, nous avons également mis en évidence *in vivo*, par une stratégie de retrait de l'endothélium cérébral à l'aide d'un détergent, le 3-[(3-cholamidopropyl) diméthylammonio]-1-propane sulfonate (CHAPS), une chute drastique des taux cérébraux de BDNF (Monnier, Prigent-Tessier, *et al.* 2017). Ces résultats supportent qu'une part importante du BDNF cérébral correspond à du BDNF exprimé par l'endothélium cérébral.

En cas de pathologies associées à une dysfonction endothéliale, telles que le diabète (Navaratna *et al.* 2011), l'ischémie cérébrale (Bejot *et al.* 2011), l'hypertension (Monnier, Garnier, *et al.* 2017) ou encore l'arthrite rhumatoïde (Pedard *et al.* 2017), une diminution des taux de BDNF est observée dans la microvasculature cérébrale en relation avec une moindre production de cette neurotrophine par les CEC. De plus, chez le rat hypertendu, la diminution des taux cérébraux de BDNF observée est contrecarrée par la pratique d'un EX sur tapis roulant (Monnier, Garnier, *et al.* 2017), stratégie comportementale efficace pour augmenter le SS et s'opposer à la dysfonction endothéliale.

La régulation de l'expression du BDNF endothélial reste à ce jour peu étudiée mais les études disponibles désignent le monoxyde d'azote (NO) comme le principal modulateur de sa synthèse et de son expression. A l'étage cérébral, d'autres rôles sont également attribués au NO, notamment son implication dans l'angiogenèse (Chen, Zhang, *et al.* 2005) et la neuroplasticité (Haul *et al.* 1999; Doreulee *et al.* 2003; Katusic *et al.* 2014). Ainsi, les premiers travaux exposant des CEC en culture à un donneur de NO, le NOC-18, rapportent une induction de l'expression du BDNF dans le milieu de culture (Li *et al.* 2006). Récemment, le laboratoire a mis en évidence que des fractions enrichies en microvaisseaux cérébraux isolés à partir de cortex de rats, surexpriment la protéine BDNF après exposition de celles-ci à un donneur de NO à diffusion lente, le glycerol trinitrate (GTN). L'hypothèse d'une régulation par le NO est également soutenue par une forte corrélation entre les taux protéiques de la forme phosphorylée de la NO synthase endothéliale (eNOS)<sup>19</sup> et de BDNF, retrouvée dans les fractions enrichies en microvaisseaux cérébraux (Monnier, Prigent-Tessier, *et al.* 2017). De plus, la production de NO étant elle-même dépendante du SS (Pohl *et al.* 1986; Rubanyi *et al.* 1986), il

---

<sup>19</sup> La NO synthase endothéliale phosphorylée en sérine 1177 (p-eNOS<sup>Ser1177</sup>), représente la forme activée de la eNOS et produit 10 fois plus de NO que la forme non phosphorylée (Corson *et al.* 1996).

est cohérent de penser que l'expression du BDNF est également sous le contrôle du SS. Le laboratoire a été le premier à démontrer *in vitro*, sur un modèle de cellules HUVEC soumises à différents flux, que l'expression endothéliale de BDNF est proportionnelle au SS (Prigent-Tessier *et al.* 2013). S'ajoute à cette étude, l'accroissement du SS engendré par l'EX qui augmente l'expression endothéliale de BDNF à la fois au niveau périphérique et cérébral (Quirie *et al.* 2012; Monnier, Garnier, *et al.* 2017).

## Rôles du BDNF endothélial

### *A la périphérie*

Les recherches menées à la périphérie sur le rôle du BDNF endothélial mentionnent principalement son implication dans les processus de vasodilatation (Meuchel *et al.* 2011; Prigent-Tessier *et al.* 2013) dépendants du NO. En effet, l'ajout de BDNF exogène sur des anneaux aortiques isolés et pré-contractés induit une vasodilatation (Meuchel *et al.* 2011; Prigent-Tessier *et al.* 2013). Cette action serait médiée par sa fixation sur les récepteurs TrkB-FL présents au niveau de l'endothélium vasculaire, comme il a été démontré au niveau de l'artère mésentérique (Totoson *et al.* 2018) et l'aorte thoracique (Pedard *et al.* 2018) après l'utilisation d'un agoniste des récepteurs TrkB, le LM22A-4. Le BDNF d'origine endothélial s'avère être aussi impliqué dans les processus inflammatoires en augmentant la résistance aux signaux apoptotiques déclenchés par le TNF $\alpha$  (Takeda *et al.* 2013) et en inhibant l'adhésion leucocytaire (Takeda *et al.* 2016). Enfin, en cas de pathologies cardiovasculaires, le BDNF interviendrait à la fois dans la protection contre l'athérosclérose et la thrombose. En effet, l'absence des récepteurs TrkB endothéliaux ou une moindre sécrétion de BDNF est associée à une augmentation des dépôts lipidiques, de l'infiltration des macrophages et de la réponse inflammatoire des souris déficientes en Apolipoprotéine E (Jiang *et al.* 2015), ou à un phénotype pro-thrombotique chez la souris Val66Met soumise à un stress chronique (Sandrini *et al.* 2018).

### *Au niveau cérébral*

Au niveau cérébral, les rôles du BDNF endothélial restent encore assez hypothétiques et n'ont suscité un intérêt que depuis que le lien entre dysfonction endothéliale et troubles cognitifs a été établi. Parmi ces rôles, il semblerait qu'il soit là encore impliqué dans la vasodilatation des vaisseaux cérébraux et peut être dans la neuroplasticité (Marie *et al.* 2018). Toutefois, ces études ont été conduites uniquement sur cultures cellulaires, limitant ainsi

l'interprétation des résultats. Basée sur la revue de Marie *et al.* (2018) issue du laboratoire, l'ensemble des rôles du BDNF d'origine endothélial sont décrits ci-après.

#### *Vasodilatation et circulation cérébrale*

L'équipe de Santhanam *et al.* (2010) démontre que dans l'artère cérébrale (basilaire), la surexpression du gène *bdnf* à l'aide d'un adénovirus induit une vasodilatation dépendante de la prostacycline 2, produite par les CMLV, sans modification de l'expression de la eNOS. Les auteurs montrent également de manière sélective que la surexpression de BDNF potentialise les effets relaxants de l'acétylcholine et de l'acide arachidonique sur des artères pré-contractées, alors que l'utilisation d'un donneur de NO n'a pas d'effet. Plus récemment, des données obtenues au laboratoire ont montré que l'ajout de BDNF exogène sur l'artère cérébrale moyenne pré-contractée conduit à sa relaxation (Marie *et al.* 2018; Bordy *et al.* 2019). Ces travaux révèlent le rôle vasodilatateur du BDNF via la libération de facteurs vasorelaxants.

#### *Angiogenèse cérébrale*

L'exposition de cultures de CEC sur matrigel à du BDNF recombinant induit leur survie et aboutit à la formation de néovaisseaux (Kim *et al.* 2004). Les effets angiogéniques semblent être la conséquence de l'activation de la voie PI3K-Akt en réponse à la fixation du BDNF aux récepteurs TrkB-FL (Kim *et al.* 2004). De plus, les AVC, l'EX ou l'hypoxie connus pour être associés à un processus d'angiogenèse sont des conditions aboutissant à la stimulation de la synthèse de BDNF par les CEC (Krupinski *et al.* 1994; Kim *et al.* 2004; Bloor 2005; Krock *et al.* 2011).

#### *Neuroplasticité*

La dernière hypothèse serait que le BDNF d'origine endothélial puisse jouer un rôle dans les processus neuroplastiques, mais à ce jour, aucune étude n'a pu démontrer directement cette fonction potentielle. Trois propositions sont envisagées et illustrées dans la figure 15:

1. La présence de récepteurs TrkB endothéliaux membranaires laisse supposer que le BDNF dérivé de l'endothélium puisse se fixer de façon autocrine à ses récepteurs et déclencher une augmentation de la production de NO. En effet, il a été montré *in vitro* que le BDNF stimule la production de NO par les neurones et les astrocytes (Biojone *et*

*al.* 2015). Une fois produit, le NO diffuserait ensuite de la CEC au neurone pour impacter positivement la neuroplasticité (Hopper *et al.* 2006; Biojone *et al.* 2015).

2. La seconde possibilité serait que le BDNF endothélial puisse se lier directement aux récepteurs TrkB-FL neuronaux et déclencher les voies de signalisation impliquées dans la plasticité. La proximité entre les synapses et les capillaires rend plausible cette éventualité qui pour autant n'a pas encore été démontrée.
3. Enfin, la dernière possibilité suspecte l'implication des astrocytes et des récepteurs TrkB-T1 (Rose *et al.* 2003; Colombo *et al.* 2012). Comme il a été mentionné plus tôt, les récepteurs TrkB tronqués sont capables de former un complexe BDNF-TrkB, qui sera internalisé et relargué par la suite (Alderson *et al.* 2000). Cette hypothèse implique que le complexe BDNF endothélial-TrkB-T1 puisse être dans un premier temps séquestré par les astrocytes puis libéré dans l'espace extracellulaire pour se fixer ensuite aux récepteurs TrkB-FL neuronaux.

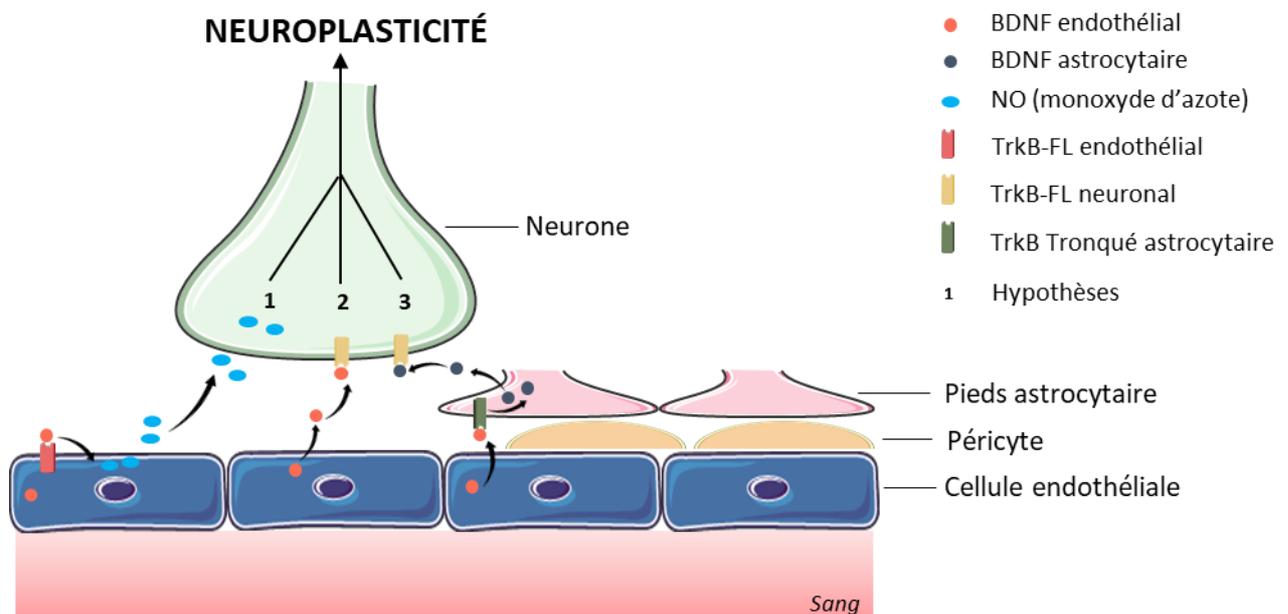


Figure 15 : Représentation des effets neuroplastiques du BDNF d'origine endothélial.

Illustration des trois hypothèses évoquées dans le paragraphe « neuroplasticité », d'après la revue Marie *et al.* (2018).

### c. Le muscle

Au niveau anatomique, trois types de tissus musculaires sont retrouvés dans l'organisme :

- Le muscle strié squelettique, sous le contrôle du SNC

- Le muscle strié cardiaque, sous le contrôle du système nerveux autonome (SNA)
- Le muscle lisse, sous la dépendance du SNA

Ces trois tissus ont la particularité de pouvoir se contracter et se distinguent par les cellules musculaires qui les composent (rhabdomyocyte, cardiomyocyte, léiomyocyte). Même s'il a été démontré que les cardiomyocytes expriment le BDNF, un intérêt sera porté uniquement sur le muscle strié squelettique (MSS) et le muscle lisse, qui ont fait l'objet d'études plus approfondies durant mon travail de thèse.

### ***Le muscle strié squelettique***

De manière générale, les MSS sont présents en grande partie dans l'organisme et représentent entre 40 et 50% du poids du corps. Comme le muscle cardiaque, le muscle squelettique a la particularité d'être strié et de présenter une organisation régulière des filaments. A l'étage cellulaire, le MSS se compose de fibres musculaires extrafusales polynucléées, appelées cellules musculaires striées ou rhabdomyocytes, de fibres intrafusales (fuseaux neuromusculaires) qui contiennent les motoneurones et de cellules souches quiescentes mononucléées, nommées cellules satellites. Chaque fibre musculaire extrafusale est innervée par un motoneurone, mais un motoneurone peut innerver plusieurs fibres. Les potentiels d'action délivrés au niveau de la jonction neuromusculaire (JNM) formée entre un motoneurone et un rhabdomyocyte sont exclusivement initiés par l'acétylcholine. Les cellules satellites quant à elles sont situées sous la lame basale des rhabdomyocytes, permettant à la fois la croissance et la régénération des fibres musculaires. L'ensemble des types cellulaires est résumé dans la figure 16.

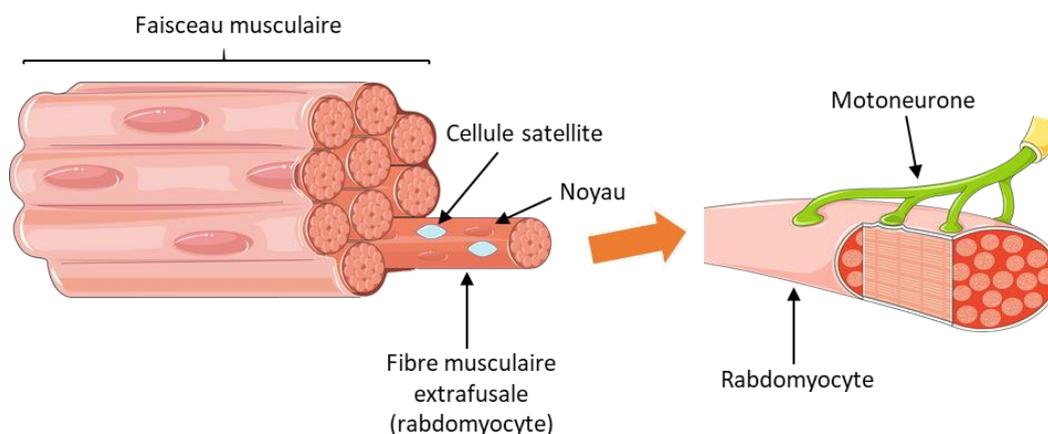


Figure 16 : Composition cellulaire du muscle squelettique.

Parmi les fibres musculaires extrafusales, deux types sont à distinguer en fonction de la filière métabolique sollicitée :

- Les fibres de type I dites oxydatives, à contraction lente,
- Les fibres de type II (a, b) dites glycolytiques, à contraction rapide.

Les caractéristiques morphologiques et fonctionnelles de ces fibres sont décrites dans le tableau 1.

La répartition des fibres au sein d'un muscle dépend à la fois du rôle et de la localisation de celui-ci. Cette typologie peut varier au cours de la vie grâce à différents facteurs, notamment l'EX.

**Tableau 1 : Caractéristiques des fibres musculaires extrafusales**

| Caractéristiques               | Fibres musculaires |          |              |
|--------------------------------|--------------------|----------|--------------|
|                                | type I             | type IIa | type IIb     |
| Taille et diamètre             | +                  | ++       | +++          |
| Résistance à la fatigue        | +++                | ++       | +            |
| Vitesse de contraction         | +                  | ++       | +++          |
| Métabolisme                    | oxydatif           | mixte    | glycolytique |
| Vascularisation                | +++                | ++       | +            |
| Vitesse de conduction nerveuse | +                  | +++      | +++          |

Le MSS est un organe capable de sécréter des molécules afin de communiquer avec d'autres tissus. Décrit comme un organe endocrine, il serait aussi capable de produire des médiateurs ayant une action endocrine, paracrine et autocrine. Parmi ces médiateurs, le BDNF est aujourd'hui suspecté. A cet égard, les travaux de Griesbeck *et al.* (1995) furent les premiers à caractériser par Northern blot, l'expression à la fois du gène *bdnf* et celui d'autres neurotrophines, les NT-3 et 4, dans le muscle gastrocnémien après une lésion du nerf sciatique chez l'animal. Par la suite, la technique d'hybridation *in situ* a permis de mettre en évidence que cette expression musculaire de BDNF était localisée au niveau des fibres musculaires chez le rat adulte (Liem *et al.* 2001) et chez l'Homme (Colombo *et al.* 2013). Toutefois les travaux de Mousavi *et al.* (2006) viennent s'opposer à ces résultats, et rapportent que l'expression du BDNF n'est pas retrouvée au sein des fibres musculaires matures mais plutôt au niveau des

cellules satellites, situées entre la lame basale et la fibre musculaire. En effet, une forte corrélation entre les expressions des ARNm BDNF et des ARNm Pax3 (Paired box 3), marqueur spécifique des cellules satellites, a été obtenue dans le muscle soléaire, le diaphragme et le muscle long extenseur (Mousavi *et al.* 2006). Par technique d'immunofluorescence, les auteurs rapportent aussi une colocalisation des marquages spécifiques de BDNF et Pax7 (paralogue de Pax3), dans le diaphragme de rats adultes. Cette colocalisation a ensuite été confirmée par un marquage spécifique de BDNF dans des cellules satellites en culture (Mousavi *et al.* 2006). Au niveau de la JNM, il semblerait que le BDNF ne soit pas détectable (Mousavi *et al.* 2006), pour autant en condition d'EX, une augmentation de l'expression du BDNF a été observée dans les motoneurones de rats (Gomez-Pinilla *et al.* 2002). Malgré ces données contradictoires, il semblerait que l'expression musculaire de BDNF dépende du type de fibres musculaires présentes dans le muscle étudié. Des taux de BDNF plus importants ont été retrouvés au niveau des muscles riches en fibres lentes par rapport aux fibres rapides (soléaire vs gastrocnémien) (Ogborn *et al.* 2010). Néanmoins, ces études ne se sont pas intéressées au type cellulaire à l'origine de cette expression, limitant ainsi leur interprétation. A cet égard, il est important de souligner que la proportion en cellules satellites et la vascularisation (la proportion en CE, 1 capillaire/fibre de type I et 0.4-0.7 capillaires/fibre de type II) sont des paramètres qui peuvent également varier en fonction des muscles. Les cellules satellites et endothéliales s'avèrent être plus abondantes dans les muscles à métabolisme oxydatif que glycolytique (Schiaffino *et al.* 2011; Yin *et al.* 2013). Très récemment, il a été mis en évidence que la surexpression de BDNF favorise la mise en place de gènes impliqués dans le phénotype glycolytique des fibres musculaires, s'opposant ainsi aux études suggérant une proportion de BDNF plus importante dans les muscles à métabolisme oxydatif (Delezie *et al.* 2019).

De la même façon, l'expression des récepteurs TrkB semble également varier en fonction du muscle (Lomen-Hoerth *et al.* 1995; Sakuma *et al.* 2001) puisque des taux plus importants ont été retrouvés dans le muscle soléaire comparé au muscle gastrocnémien. Ces différences pourraient s'expliquer par des proportions plus importantes de CE et/ou de mitochondries puisque par immunohistochimie, il a été mis en évidence la présence de ces récepteurs principalement au niveau de la membrane mitochondriale (Wiedemann *et al.* 2006). Les auteurs suggèrent que les mitochondries stockeraient les neurotrophines afin de les utiliser comme molécules de signalisation. Cependant, l'expression des récepteurs TrkB reste plus faible dans le tissu musculaire que celle des récepteurs p75, retrouvés en plus grande

proportion au niveau des progéniteurs et des fibres musculaires matures (Mousavi *et al.* 2006; Colombo *et al.* 2011; Colombo *et al.* 2013).

### ***Le muscle lisse***

Le muscle lisse forme des couches denses de cellules mononuclées qui tapissent la paroi interne des vaisseaux et des organes creux, comme les intestins. Les travaux de Donovan *et al.* (1995) furent les premiers à mettre en évidence chez le rat *in vivo* et chez l'humain *in vitro*, par immunohistochimie et RT-qPCR, que les CMLV expriment à la fois les neurotrophines BDNF, NGF, NT-3 et leurs récepteurs TrkA, B et C. D'autres travaux (Nemoto *et al.* 1998; Lommatzsch *et al.* 1999), notamment issus du laboratoire montrent également une expression du BDNF dans les CMLV de l'aorte abdominale, des artères coronariennes (Prigent-Tessier *et al.* 2013), mésentériques (Otani *et al.* 2015) et pulmonaires (Hartman *et al.* 2015). Dans l'artère pulmonaire humaine, les expressions de BDNF et des récepteurs TrkB-FL et T1 sont augmentées en condition hypoxique (Hartman *et al.* 2015). Toutefois, cette expression musculaire de BDNF reste plus faible comparée à celle retrouvée dans les CE (Prigent-Tessier *et al.* 2013).

### **Rôle du BDNF musculaire**

#### ***Le MSS***

Les rôles du BDNF dans le MSS sont peu étudiés comparés aux rôles du BDNF cérébral. Parmi les études disponibles, force est de constater que son implication au niveau musculaire n'est pas claire. Il semblerait que le BDNF influence la mise en place des JNM, en régulant à la baisse le regroupement des récepteurs à l'acétylcholine induit par la protéine Agrine<sup>20</sup> (Wells *et al.* 1999) et en inhibant leurs maturations (Song *et al.* 2015). Très récemment, des données obtenues à partir d'une souris KO BDNF musculaire suggèrent que le BDNF n'affecterait ni la structure, ni la fonction des JNM mais réduirait la locomotion de l'animal (Delezie *et al.* 2019). Contrairement à d'autres facteurs neurotrophiques, le BDNF ne participerait pas à la survie des motoneurons (Tovar *et al.* 2014). En revanche, il interviendrait dans le maintien et la prolifération/différenciation de la population de cellules satellites (Mousavi *et al.* 2006) ainsi que dans le remodelage des fibres musculaires (Clow *et al.* 2010). La myogenèse et la réparation des fibres semblent être déclenchées via la fixation du BDNF aux récepteurs p75

---

<sup>20</sup> L'agrine est une protéoglycane à sulfate d'héparane, présente de manière abondante au niveau de la JNM et dirigeant principalement sa différenciation.

activant les voies de signalisation RhoA-GTP (Deponti *et al.* 2009; Colombo *et al.* 2013). Le BDNF jouerait également un rôle dans l'oxydation des lipides, puisqu'il a été montré qu'il améliore le métabolisme lipidique chez des modèles de souris obèses et diabétiques (Tsuchida *et al.* 2002). Au niveau musculaire, l'exposition de cultures de myotubes L6 (*in vitro*) et des morceaux de muscle long extenseur des orteils de rat (*ex vivo*) à du BDNF, augmente la phosphorylation des enzymes AMPK (AMP-activated protein kinase), ACC- $\beta$  (Acetyl coenzyme A carboxylase  $\beta$ ) et l'oxydation du palmitate (Matthews *et al.* 2009). En revanche, lorsque l'AMPK est bloquée par l'utilisation d'un inhibiteur ou d'un adénovirus à dominant négatif, l'oxydation des lipides est abrogée même après ajout de BDNF (Matthews *et al.* 2009; Pedersen 2009).

Enfin, d'autres travaux s'intéressent au lien entre muscle et cerveau, en suspectant le muscle comme étant à l'origine des effets bénéfiques de l'EX sur la cognition. La production de médiateurs comme le BDNF laisse penser qu'il pourrait impacter positivement la plasticité cérébrale, une fois libéré par le muscle en réponse à l'EX. Cependant, l'étude de Matthews *et al.* (2009) contredit cette hypothèse en rapportant que les contractions induites par un EX chez l'Homme augmentent les taux de BDNF dans les biopsies musculaires mais pas dans le sang. Les auteurs déclarent que l'action du BDNF musculaire ne serait en réalité qu'autocrine et/ou paracrine. Toutefois, cette étude qui est la seule, ne peut pas exclure que le BDNF libéré en réponse aux contractions musculaires soit capté et stocké par les plaquettes, ou véhiculé dans la circulation par de petites vésicules extracellulaires, comme les exosomes<sup>21</sup> (Safdar *et al.* 2016).

Encore à l'état de découverte, les études montrent que le destin de ces vésicules semble dépendre de leur composition intracellulaire et des protéines cargo présentes à leur surface. La capacité du muscle à relarguer des exosomes contenant une centaine de protéines (Aswad *et al.* 2014) et la présence de BDNF détectée dans des exosomes circulants d'origine cérébrale (marquage L1-CAM) (Suire *et al.* 2017), supporte l'hypothèse que le muscle en réponse à l'EX pourrait être responsable des effets positifs de l'EX sur le cerveau grâce à ce système de communication (Safdar *et al.* 2016).

---

<sup>21</sup> Décrits pour la première fois en 1983 (Pan *et al.* 1983), les exosomes sont de petites vésicules capables de transférer des informations à d'autres cellules en utilisant différentes catégories de molécules qu'elles peuvent contenir, telles que des peptides, des acides nucléiques, des lipides. Ce processus hautement conservé chez les eucaryotes, procaryotes et les plantes, est utilisé par différents types cellulaires.

### ***Le muscle lisse***

Au sein du muscle lisse, le rôle du BDNF est très peu étudié, limitant le nombre d'études disponibles. La plupart des travaux portant sur l'expression vasculaire de BDNF s'intéressent principalement à son origine endothéliale plutôt que musculaire étant donné sa proportion plus importante dans l'endothélium. Malgré tout, il a été mis en évidence *in vitro* que l'exposition de CMLV d'artères pulmonaires à du BDNF augmente leur prolifération et la concentration intracellulaire de  $Ca^{2+}$  en condition d'hypoxie (Kwapiszewska *et al.* 2012; Hartman *et al.* 2015). Toutefois, ces observations n'ont pas été retrouvées au niveau des CMLV de l'artère mésentérique, en condition physiologique (Otani *et al.* 2015).

## C. Exercice physique et BDNF

Ce sont les travaux de Neeper *et al.* (1995) qui montrent pour la première fois que la pratique d'un EX volontaire chez le rongeur stimule l'expression du gène *bdnf* dans l'hippocampe et le cortex préfrontal. De plus, cette expression est corrélée à la distance parcourue dans une roue en libre accès. Cette découverte originale, amènera par la suite, d'autres auteurs à confirmer l'augmentation importante des taux cérébraux de BDNF suite à la réalisation d'un EX, qu'il soit volontaire ou imposé (Oliff *et al.* 1998; Berchtold *et al.* 2005; Griffin *et al.* 2009; Vivar *et al.* 2013). Dans l'ensemble, ces travaux ont ouvert le champ quant à la possibilité que le BDNF soit à l'origine des effets positifs de l'EX sur le cerveau.

### 1. Le BDNF : médiateur des effets bénéfiques de l'EX

Le constat que le BDNF et l'EX partagent les mêmes effets sur le cerveau est le premier argument en faveur de l'implication du BDNF dans les effets positifs de l'EX sur la santé cérébrale. En effet, le BDNF et l'EX sont tous deux en mesure de stimuler la plasticité cérébrale, et les études menées chez l'Homme et l'animal s'accordent à dire que les processus de neurogenèse, de synaptogenèse et de neuroplasticité sont déclenchés par l'EX à la suite de l'augmentation des taux cérébraux de BDNF.

En second lieu, l'utilisation de stratégies s'opposant aux effets du BDNF « anti-BDNF » conforte cette idée, puisque l'utilisation d'un anticorps anti- TrkB-IgG (Vaynman *et al.* 2004) ou d'un antagoniste des récepteurs TrkB, le K252 (Vaynman *et al.* 2003; Liu *et al.* 2008) bloque les effets de l'EX sur la plasticité cérébrale. Une diminution de l'expression de marqueurs neuroplastiques (SYP) et de la mémoire spatiale des animaux est d'ailleurs observée dans ces conditions (Vaynman *et al.* 2003; Liu *et al.* 2008). Par ailleurs, l'inactivation du gène codant pour le récepteur TrkB dans des progéniteurs neuronaux d'hippocampe empêche l'induction de la neurogenèse (Li *et al.* 2008) et de la LTP (Bergami *et al.* 2008) en réponse à l'EX. En cas de lésion cérébrale traumatique par percussion liquidienne chez le rat<sup>22</sup>, Griesbach *et al.* (2009) rapporte

---

<sup>22</sup> Modèle de lésion de percussion liquidienne aussi appelé Fluid percussion injury (FPI). C'est un modèle de traumatisme crânien chez le rongeur.

que l'administration d'un anticorps anti- TrkB-IgG empêche l'amélioration de la mémoire spatiale des animaux lésés et diminue les expressions hippocampiques de CREB et de SYP et ce, malgré la pratique d'un EX de 7 jours dans une roue libre d'accès. S'ajoute à ces arguments, une absence de neuroprotection induite par l'EX chez des souris hétérozygotes pour le gène *bdnf* après une injection de MPTP<sup>23</sup> (1-méthyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine), une neurotoxine responsable de la destruction des neurones dopaminergiques de la substance noire, comparées à des souris sauvages (Gerecke *et al.* 2012). Parallèlement, chez l'Homme ou dans des modèles animaux mimant le polymorphisme Val66Met<sup>24</sup> du gène *bdnf* (Erickson *et al.* 2012; Hopkins *et al.* 2012; Ieraci *et al.* 2016), l'EX ne restaure ni les taux cérébraux de BDNF, ni les déficiences cognitives causées par ce polymorphisme.

L'ensemble de ces données atteste que les effets positifs de l'EX sur la santé cérébrale sont à relier de manière incontestable à une augmentation des taux cérébraux de BDNF. Cependant, les modalités d'EX les plus efficaces pour améliorer cette plasticité cérébrale restent encore mal décrites tant chez l'Homme que chez l'animal.

## 2. Impact des modalités de l'EX sur le BDNF et la neuroplasticité

Mes travaux de thèse ayant été menés sur le modèle animal, seules les études relatant des effets des modalités de l'EX en endurance sur les taux de BDNF et la plasticité cérébrale chez l'animal seront illustrées. Il convient de préciser que les travaux chez l'Homme ne permettent pas d'interpréter totalement les taux de BDNF en réponse à l'EX, puisqu'ils ne sont mesurés qu'au niveau sanguin ou dans des biopsies musculaires. L'expérimentation animale s'affranchit de ce problème en permettant de mesurer les taux de BDNF directement dans les régions cérébrales et/ou les tissus périphériques et de cibler l'origine tissulaire et/ou cellulaire des effets observés.

### a. Durée

Le paramètre de la durée a d'abord été étudié en 2005 par l'équipe de Berchtold *et al.* (2005) chez des rats ayant un accès libre quotidien à une roue d'entraînement pendant 2, 4, 7,

---

<sup>23</sup> Le MPTP est une neurotoxine synthétique capable d'induire une mort neuronale dans la substance noire. C'est une molécule souvent utilisée comme modèle pharmacologique de la MP, car l'injection de cette toxine provoque des symptômes permanents caractéristiques de la maladie.

<sup>24</sup> Modèle animal mimant le polymorphisme Val66Met : souris homozygotes BDNF<sup>Met/Met</sup>.

14, 28 et 90 jours. Les résultats montrent que les taux protéiques de BDNF dans l'hippocampe augmentent graduellement en fonction du nombre de jours d'EX pratiqué. Toutefois, cet effet n'est significatif qu'à partir de 14 jours d'EX et perdure jusqu'à 90 jours. Ces résultats suggèrent qu'une dizaine de jours d'EX est nécessaire pour augmenter significativement le BDNF hippocampique. Par la suite, l'équipe de Ferreira *et al.* (2011) a évalué l'effet de 3, 7 et 15 jours d'EX imposé chez le rat. Chaque session d'EX était réalisée sur un tapis roulant durant 40 min à la vitesse de 10 m/min. Les résultats n'ont pas révélé d'effet significatif de l'EX sur la production hippocampique de BDNF (ARNm et protéine), quelle que soit la durée de l'effort. En dépit de ces résultats, des changements positifs des marqueurs neuroplastiques ont été observés suggérant que ces effets ne sont pas en lien avec les taux hippocampiques de BDNF. Les auteurs proposent que d'autres facteurs neurotrophiques soient à l'origine de ces effets tels que le FGF (Fibroblast growth factor) ou l'EGF (Epidermal growth factor) puisque leurs taux ont été augmentés en réponse à l'EX. Par ailleurs, il est important de souligner que l'activité des récepteurs TrkB n'a pas été investiguée ce qui aurait permis d'identifier une implication ou non du BDNF dans ces effets. Enfin, les auteurs rapportent une augmentation des taux de SYN, protéine synaptique dont la synthèse est induite par l'expression de BDNF (Vaynman *et al.* 2006). Il est possible que l'heure de sacrifice post-EX n'ait pas été correctement choisie pour observer un effet tant sur les ARNm que la protéine BDNF, mais cette information n'a pas été partagée dans la publication.

La troisième étude menée par Sheikhzadeh *et al.* (2015) chez le rat, compare deux EX imposés de 2 et 8 semaines, avec des sessions quotidiennes de 60 min à intensité progressive (5 à 22 m/min). Par mesure ELISA (directement post-EX), aucun effet de la durée et de l'intensité de l'EX n'a été observé sur les taux cérébraux de BDNF, alors que le protocole était considérablement plus long que celui de Ferreira et similaire à celui de Berchtold. L'absence d'effet de la durée de l'EX constaté dans les travaux de Ferreira et Sheikhzadeh suggère qu'un EX volontaire soit plus efficace qu'un EX imposé. Cependant, l'utilisation de la roue d'entraînement ne permet pas de maintenir une intensité et une fréquence stable de course.

#### **b. Fréquence**

La littérature est pauvre quant à l'effet de la fréquence de l'EX sur les taux cérébraux de BDNF et la plasticité cérébrale. L'étude menée par Costa *et al.* (2012) chez le rat, compare l'effet de 3 fréquences d'EX sur les taux hippocampiques de BDNF et évalue en parallèle si la

fréquence de l'EX modifie l'expression du BDNF en fonction de l'âge des animaux. Les auteurs comparent ainsi des rats juvéniles (3 mois) à des rats âgés (14-16 mois) soumis soit à 1, 3 ou 7 jours d'EX par semaine sur tapis, pendant 8 semaines. L'intensité de l'effort réalisé sur une durée de 20 min par session, était comprise entre 60 et 75 % de leur VO<sub>2</sub> max, la vitesse du tapis étant ainsi adaptée pour maintenir une intensité constante. Les auteurs montrent une augmentation significative des taux hippocampiques de BDNF seulement chez les rats de 3 mois pratiquant un EX par semaine. De manière étonnante, l'expression des récepteurs TrkB était significativement diminuée chez les rats exercés, quelle que soit la fréquence d'EX, comparée aux rats SED. Des améliorations de la mémoire à court et long terme (NORT) ont également été obtenues après 8 semaines d'EX. Chez les rats âgés, aucun effet n'a été constaté. Pour autant, une amélioration significative de la mémoire a été obtenue lorsqu'un EX par semaine était pratiqué pendant 8 semaines.

Comme abordé auparavant, le BDNF joue un rôle délétère en cas de douleurs neuropathiques. Dans ce contexte, la constriction chronique du nerf sciatique<sup>25</sup> chez le rat soumis à un EX imposé de haute fréquence (5 fois/semaine pendant 5 semaines) réduit significativement les taux de BDNF au niveau de la moelle épinière, alors qu'un EX de basse fréquence (3 fois/semaine pendant 5 semaines) n'a pas d'effet (Sumizono *et al.* 2018). Ces travaux montrent que la fréquence de l'EX est un paramètre à prendre en compte dans l'élaboration de stratégies visant à réduire ce type de douleur induite par une activation microgliale associée à une surexpression de BDNF.

### c. Intensité

De manière générale, chez l'animal, l'étude de l'intensité de l'EX nécessite l'utilisation d'un protocole d'EX imposé sur tapis roulant. Parmi les données de la littérature, chaque étude a eu recours à un protocole différent réalisé dans des conditions distinctes (rats juvéniles, différents stades postnataux, animaux ayant été soumis à une ischémie cérébrale). Les études mentionnées chronologiquement témoignent de la disparité des résultats.

L'étude de Soya *et al.* (2007) évalue chez le rat (11 semaines) l'impact de l'intensité d'un EX aigu, après 7 sessions d'entraînement au préalable sur tapis roulant. Pour optimiser les

---

<sup>25</sup> Modèle animal mimant une douleur neuropathique engendrée par la constriction chronique du nerf sciatique.

conditions d'EX, les auteurs utilisent le seuil lactique<sup>26</sup> comme index physiologique de l'intensité de l'EX. Ainsi, deux groupes ont été comparés, l'un réalisant un EX aigu à 15 m/min d'intensité modérée (sous le seuil lactique) et l'autre réalisant un EX aigu à 25 m/min, d'intensité soutenue (supérieur au seuil lactique). A l'issue de cet unique effort de 30 min, les auteurs montrent par la technique d'hybridation *in situ*, une augmentation significative des ARNm BDNF dans l'hippocampe des rats du groupe d'intensité modérée comparés aux rats du groupe d'intensité soutenue, alors que les taux protéiques de BDNF (ELISA) sont inchangés entre les deux intensités d'EX. Les données laissent supposer qu'un EX de faible intensité serait préférable à celui d'intensité soutenue. En effet, les taux plasmatiques de corticostérone sont plus élevés chez les animaux du groupe de forte intensité. Or l'hippocampe est une structure riche en récepteurs aux glucocorticoïdes et il a été montré que la corticostérone diminue l'expression hippocampique du BDNF (Schaaf *et al.* 1998). Néanmoins, l'interprétation des taux de BDNF reste limitée puisque le dosage par ELISA ne discrimine pas le BDNF mature de sa forme précurseur.

L'étude de Lou *et al.* (2008), menée chez le rat juvénile (5 semaines), compare trois intensités d'EX, légère (5 min à 5 m/min, 5 min à 8 m/min, 20 min à 11 m/min), modérée (5 min à 5 m/min, 5 min à 11 m/min, 20 min à 14 m/min) et élevée (5 min à 8 m/min, 5 min à 11 m/min, 20 min à 22 m/min), pratiquées 30 min/jour pendant 7 jours sur tapis roulant. Une augmentation significative des ARNm BDNF a été observée uniquement chez les rats soumis à une intensité légère comparés aux rats SED. De manière surprenante, aucune différence significative n'a été constatée entre les animaux des groupes d'intensité modérée ou élevée comparés aux animaux SED. De plus, les taux d'ARNm BDNF sont diminués significativement chez les animaux du groupe d'intensité élevée par rapport à celui d'intensité légère, laissant supposer que la diminution de l'expression du BDNF est dépendante du niveau d'intensité de l'EX. Ces mêmes auteurs montrent que l'expression des récepteurs NMDA et la neurogenèse dans le GD sont diminuées en fonction de l'intensité de l'EX, suggérant un impact négatif de l'intensité sur les processus neuroplastiques BDNF dépendants.

---

<sup>26</sup> Le seuil lactique permet de déterminer l'intensité de l'EX à laquelle une augmentation de la lactatémie au de-là des valeurs basales est observée (au-dessus de 1 mM). D'après Svedahl *et al.* (2003), le point d'inflexion de la courbe correspond à un équilibre entre production/élimination du lactate pour une intensité optimale. Passé ce point, la production de lactate devient supérieure à la consommation de lactate, signifiant que l'intensité est au-dessus du seuil lactique.

L'étude de Almeida *et al.* (2013) évalue l'impact de l'intensité de l'EX sur les taux hippocampiques de BDNF et sur la prolifération cellulaire durant le développement postnatal du cerveau. Les auteurs utilisent des rats à différents stades postnataux, P21-P31-P41-P51, et comparent à chaque stade l'effet d'un EX d'intensité légère à un EX de forte intensité, pratiqué 30 min/jour pendant 10 jours. Mesurés par la technique ELISA, les taux hippocampiques de BDNF sont significativement augmentés en fonction du niveau d'intensité de l'EX seulement chez les rats P41. Aucune différence significative n'a été obtenue entre les rats des groupes d'intensité légère et élevée aux stades P21, P31 et P51. Parallèlement, l'expression du marqueur Ki-67 (prolifération cellulaire) est significativement plus élevée lorsque l'EX est pratiqué à allure légère chez les animaux P21 et à allure intense chez les animaux P31. Aux stades postnataux P41 et P51, aucun effet de l'EX n'a été observé sur la prolifération cellulaire.

Enfin, l'étude de Shih *et al.* (2013) évalue les taux cérébraux de BDNF et la mémoire spatiale (test de la piscine de Morris) chez des rats ayant subi une occlusion de l'artère cérébrale moyenne. Dans ce contexte, la pratique d'un EX (30 min pendant 14 jours) d'intensité légère (8 m/min) commençant 24h après l'ischémie cérébrale, conduit à une amélioration des processus neuroplastiques comparé à un EX de forte intensité (20 m/min). Les augmentations hippocampiques des taux protéiques de BDNF et des marqueurs neuroplastiques (SYP et PSD-95) sont également associées à une meilleure mémoire spatiale des rats ischémiés soumis à un EX d'intensité légère. D'après ces conditions expérimentales, en cas de pathologies cérébrovasculaires, l'EX de faible intensité serait plus bénéfique qu'un effort intense.

Les résultats sont complexes (âge-dépendant) et parfois surprenant (P21 vs P31) mais démontrent tout de même que l'intensité de l'EX ne doit pas être trop soutenue afin d'éviter les effets délétères qui peuvent être observés.

#### **d. Contractions musculaires**

Lors de la pratique d'un EX, le muscle peut se contracter en se raccourcissant (contraction concentrique), en s'allongeant (contraction excentrique) ou sans changer sa longueur (contraction isométrique). Ces différentes contractions sont modulées en fonction du type d'EX pratiqué sur une surface inclinée ou non. A ce jour, seulement quatre études se sont intéressées à l'impact des contractions excentriques et concentriques sur l'expression du BDNF et la plasticité cérébrale. Les deux premières études ont été menées sur l'effet d'un EX excentrique par l'équipe d'Aguiar et ces collaborateurs. La première étude met en évidence

chez la souris âgée de 6 semaines, qu'un protocole d'EX réalisé sur un tapis roulant incliné négativement (16°), à raison de 5 sessions de 20 min/semaine pendant 8 semaines, diminue significativement les taux corticaux de BDNF (Aguiar *et al.* 2007) par rapport à des animaux SED. En opposition avec ces résultats, ils rapportent ensuite une augmentation significative des taux protéiques de BDNF dans l'hippocampe et le striatum de souris soumises à 5 sessions d'EX excentrique de 45 min/semaine, d'intensité progressive (13.5 à 16.5 m/min) pendant 8 semaines (Aguiar *et al.* 2008).

Au laboratoire, nous avons mis en évidence que l'EX excentrique (inclinaison de -10%) augmente significativement les taux protéiques de BDNF dans le cortex sensorimoteur de rats. Cependant, l'augmentation est significativement plus faible qu'après un EX pratiqué sur un tapis roulant en position horizontale (Banoujaafar *et al.* 2014). Enfin, seulement une étude a comparé l'effet d'un EX concentrique et excentrique (Pedard *et al.* 2019), sans toutefois mettre en évidence de différences entre les deux modalités de contraction lors de l'EX, dans le cortex préfrontal, sensorimoteur et l'hippocampe.

### **3. Lien entre EX et augmentation de la production cérébrale de BDNF**

Les travaux dédiés à la compréhension des mécanismes par lesquels l'EX augmente les taux cérébraux de BDNF se multiplient dans la littérature depuis quelques années. Jusqu'à récemment, le mécanisme le plus évoqué était celui de l'augmentation de l'activité neuronale. Cependant, les découvertes récentes mettant en évidence que l'endothélium répond à l'EX par une augmentation de BDNF désigne le flux sanguin comme un potentiel modulateur de l'effet positif de l'EX sur le BDNF. Il n'est pas exclu également qu'une augmentation des facteurs circulants périphériques et/ou cérébraux, d'origine endothéliale et/ou musculaire puissent contribuer à l'augmentation cérébrale de cette neurotrophine. Les principaux mécanismes sont ainsi détaillés après.

#### **a. L'activité neuronale**

Pendant l'EX, l'activité neuronale augmente de façon proportionnelle à l'intensité de l'EX (Czurko *et al.* 1999; Querido *et al.* 2007). L'augmentation de l'activité neuronale, en réponse à l'EX, a pu être observée à la fois dans les régions corticales et sous-corticales, comme l'hippocampe (Nishijima *et al.* 2012) et les ganglions de la base (Shi *et al.* 2004). Au vu de ces

données, il est logique de penser que l'induction de l'expression du BDNF par la pratique d'un EX soit donc à relier à l'activité des neurones. Ainsi, des stratégies visant à bloquer l'activité neuronale annulent les effets de l'EX sur les taux cérébraux de BDNF. L'administration de molécules neurotoxiques spécifiques des voies noradrénergique (N-(2-chloroethyl)-N-ethyl-2-bromobenzylamine) et sérotoninergique (p-chloroamphetamine) bloque la surexpression des messagers BDNF observée dans l'hippocampe de rats ayant un accès libre à une roue (Garcia *et al.* 2003). De la même manière, l'utilisation d'antagonistes spécifiques des récepteurs sérotoninergiques et noradrénergiques durant l'activité locomotrice des rats, s'oppose à l'augmentation de l'expression des ARNm BDNF dans l'hippocampe (Ivy *et al.* 2003). Le blocage de l'action du glutamate représente également une stratégie visant à comprendre l'implication de l'activité neuronale dans la surexpression de BDNF induite par l'EX. En effet, l'utilisation d'antagonistes des récepteurs NMDA, bloque l'augmentation des ARNm BDNF en réponse à l'EX (Vaynman *et al.* 2003). Dernièrement, l'évaluation de l'expression d'un marqueur de l'activité neuronale, c-fos a montré chez la souris que l'expression de ce marqueur était concomitante à celle des ARNm BDNF dans l'hippocampe (Dong *et al.* 2006). De plus, en cas d'EX aigu, une corrélation positive entre l'expression cérébrale de BDNF et la densité de cellules c-fos<sup>+</sup> a été mise en évidence, renforçant ainsi le lien entre l'activité neuronale induite par l'EX et la production cérébrale de BDNF (Tsai *et al.* 2019).

#### **b. Le flux sanguin cérébral**

Comme évoqué dans la partie B du manuscrit, l'endothélium est une source cellulaire cérébrale riche en BDNF. Pour rappel, le retrait de l'endothélium cérébral par un détergent, le CHAPS, conduit à une diminution drastique (~50%) des taux cérébraux de BDNF. Il y a un peu plus d'une décennie, l'hypothèse d'une implication du flux sanguin cérébral dans l'augmentation des taux de BDNF par l'EX a été émise. En effet, l'EX conduit à une élévation du SS qui stimule l'expression de la eNOS conduisant ainsi à la production de NO. L'inhibition pharmacologique de la production de NO par le L-NAME (Chen *et al.* 2006) ou la délétion génétique de la eNOS par l'utilisation de souris KO eNOS (Endres *et al.* 2003) ont montré une abolition des effets de l'EX. A l'inverse, l'augmentation de la production de NO stimule la synthèse et la libération de BDNF. Des travaux du laboratoire ont conforté ces données en montrant que l'augmentation des taux cérébraux de BDNF induite par un EX imposé était moindre lors de l'utilisation de stratégies permettant de réduire le flux sanguin cérébral. En

effet, un EX imposé de 7 jours chez les rats ayant subi une occlusion unilatérale de la carotide (clampage irréversible) n'augmente pas les taux corticaux de BDNF comparés aux rats exercés n'ayant pas subi de clampage carotidien (Banoujaafar *et al.* 2014). Par ailleurs, l'utilisation d'un modèle d'hypertension artérielle génétique, le modèle SHR (Spontaneously hypertensive rat) soumis à un EX de 7 jours montre des taux de BDNF augmentés dans l'hippocampe mais pas dans le cortex sensorimoteur (Banoujaafar *et al.* 2014; Monnier, Garnier, *et al.* 2017; Monnier, Prigent-Tessier, *et al.* 2017). L'inhibition de la eNOS par un traitement au L-NAME chez des rats soumis à un EX bloque la surexpression corticale de BDNF observée chez des rats exercés non traités (Banoujaafar *et al.* 2014). Il est également important de noter que l'exposition de fractions enrichies en microvaisseaux cérébraux ou de coupes hippocampiques issues de rats SHR à du GTN, stimule la production endothéliale de BDNF (Monnier, Garnier, *et al.* 2017; Monnier, Prigent-Tessier, *et al.* 2017). De plus, l'utilisation d'un protocole d'EX excentrique sollicitant le système cardiovasculaire de façon moins importante qu'un EX sur tapis en position horizontale conduit à des taux protéiques de BDNF significativement plus faibles par rapport aux animaux ayant réalisé l'EX sur tapis en position horizontale (Banoujaafar *et al.* 2014).

Bien que les expériences de retrait de l'endothélium et d'exposition des microvaisseaux cérébraux à un donneur de NO n'aient pas été réalisées en condition d'EX, l'ensemble de ces données apporte des arguments forts vis-à-vis du lien entre production endothéliale de NO et production cérébrale de BDNF.

### c. Les myokines

Le muscle est capable de libérer des molécules, en réponse aux contractions, que l'on appelle, myokines. Un intérêt croissant se porte aujourd'hui sur ces molécules et leur rôle dans les effets positifs de l'EX sur le cerveau (Kim *et al.* 2019; Pedersen 2019).

#### ***L'irisine***

Parmi elles, l'irisine, découverte en 2012 (Bostrom *et al.* 2012) et connue pour être impliquée localement dans les processus de « brunissement » du tissu adipeux blanc, a fait depuis l'objet de nombreuses recherches. Produite sous le contrôle du co-activateur de transcription PGC-1 $\alpha$  (Peroxisome Proliferator Activator Receptor  $\gamma$  Coactivator-1 $\alpha$ ) (Bostrom *et al.* 2012; Wrann *et al.* 2013), elle est issue du clivage de son précurseur le FNDC5 (Fibronectin type III Domain-Containing Protein 5) et libérée sous forme d'un peptide soluble dans le sang.

Le FNDC5 est exprimé à la fois dans le muscle squelettique et le cerveau en réponse à l'EX (Ferrer-Martinez *et al.* 2002; Teufel *et al.* 2002; Wrann *et al.* 2013; Quinn *et al.* 2015; Tiano *et al.* 2015). Wrann *et al.* (2013) furent les premiers à montrer *in vitro*, sur des cultures de neurones corticaux primaires et de neurones hippocampiques que la surexpression du gène *fndc5* augmente l'expression de BDNF. A l'inverse, l'utilisation d'ARN interférents, inactivant le FNDC5, diminue les taux de BDNF. Fait intéressant, *in vivo*, cette surexpression du gène *fndc5* et sa libération au niveau du foie, conduit à la fois à l'expression hippocampique du gène *bdnf* et d'autres gènes neuro-protecteurs<sup>27</sup> tels que Arc (Activity-regulated cytoskeleton-associated protein), Zif<sup>268</sup> (zinc finger transcription factor) et c-fos. L'induction de FNDC5 dans l'hippocampe par l'EX est quantitativement comparable à l'induction observée dans le muscle squelettique, plaçant ainsi ce précurseur comme un régulateur important au niveau cérébral de l'expression du BDNF et d'autres facteurs impliqués dans les phénomènes neuroplastiques.

L'étude très récente de Lourenco *et al.* (2019) a récemment apporté des preuves de l'implication de l'irisine dans la plasticité cérébrale induite par l'EX, à l'aide de modèles animaux de la MA. Au niveau périphérique, l'administration d'un adénovirus FNDC5 dans la veine caudale chez la souris restaure les déficits mnésiques causés par l'administration intracérébrovasculaire d'oligomères A $\beta$  (A $\beta$ O). Dans ces conditions expérimentales, alors que l'expression de FNDC5/irisine dans l'hippocampe est diminuée chez les souris A $\beta$ O, l'utilisation de l'adénovirus s'oppose à cette diminution cérébrale. En seconde approche, l'administration par voie intrapéritonéale d'un anticorps anti-FNDC5 neutralisant le FNDC5, chez des souris A $\beta$ O SED et exercées, bloque l'effet positif de l'EX sur les altérations de la mémoire et de la neuroplasticité induite par l'infusion du peptide A $\beta$ . Dans la même étude, des résultats similaires ont été obtenus avec l'utilisation d'un modèle transgénique de la MA. Dans la lignée de ces résultats, des analyses post mortem menées sur des patients MA montrent une diminution des taux hippocampiques de FNDC5/irisine. Ces résultats ont été appuyés par des données *in vitro* démontrant que des neurones hippocampiques (rat) et des neurones corticaux (humain) exposés à des oligomères A $\beta$  expriment moins de FNDC5/irisine.

Pris ensemble, ces résultats innovants montrent pour la première fois le rôle du FNDC5/irisine d'origine périphérique et cérébral dans les effets positifs de l'EX sur la plasticité cérébrale.

---

<sup>27</sup> Arc, Zif<sup>268</sup>, c-fos sont des gènes d'expression précoce représentatifs d'une activité transcriptionnelle.

## La cathepsine B

La Cathepsine B (CTSB) a également été identifiée comme une nouvelle myokine par l'équipe de Moon *et al.* (2016). Cette cystéine protéase lysosomale est exprimée de façon ubiquitaire et surexprimée lors de multiples cancers (Aggarwal *et al.* 2014). En dépit de son rôle physiologique très peu étudié, il a été mis en évidence après un entraînement de longue durée, que les taux musculaires, plasmatiques et hippocampiques de CTSB étaient augmentés chez la souris. Une élévation des taux plasmatiques de CTSB a également été notée chez le singe et l'Homme. Les auteurs montrent que l'utilisation de la forme recombinante de CTSB sur des progéniteurs neuronaux d'hippocampe augmente à la fois les ARNm BDNF et les ARNm DCX. Enfin, chez des souris KO pour le gène *ctsb*, l'EX n'augmente pas la neurogénèse contrairement aux souris WT démontrant ainsi son implication dans l'induction de cette dernière.

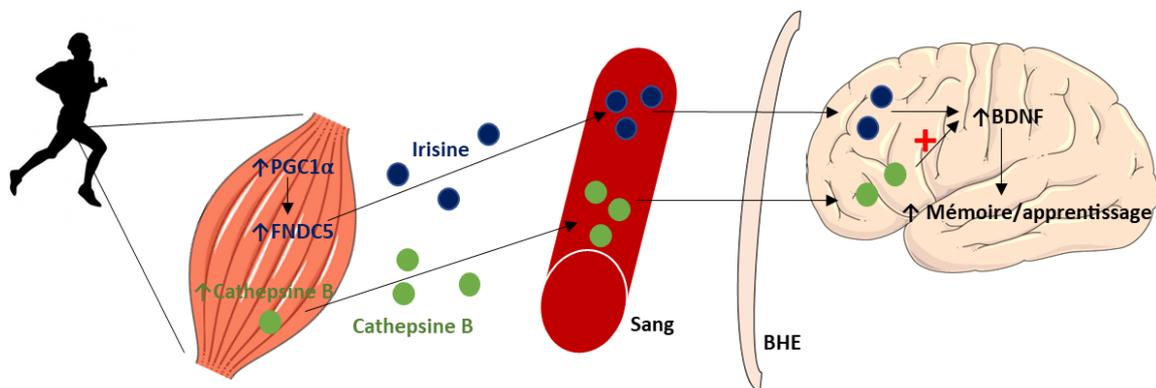


Figure 17 : Schéma illustrant l'implication de l'irisine et la cathepsine B dans les effets positifs de l'EX sur le cerveau. D'après la revue de Pedersen BK *et al.*, 2019.

Jusqu'à cette année et notamment la publication de Lourenco *et al.* (2019), les auteurs se contentaient d'augmentations musculaires et hippocampiques comparables pour relier les myokines et l'augmentation du BDNF cérébral après EX. De façon étonnante, les travaux de Lourenco *et al.* (2019) apportent les premières preuves de l'implication de l'irisine d'origine musculaire dans la neuroplasticité. En outre, la capacité de la CTSB à franchir la BHE témoigne de la possibilité que son origine périphérique influence la neuroplasticité (Kim *et al.* 2019). Ces données, bien qu'intéressantes suggèrent malgré tout, la nécessité d'un travail plus approfondi dans l'interprétation de l'élévation des taux musculaires de FNDC5 et CTSB en réponse à l'EX.

### **Le BDNF**

Comme il a été exposé dans la partie B du manuscrit, le muscle produit du BDNF, mais des résultats contradictoires ont été constatés en réponse à l'EX. En effet, certains auteurs ont mis en évidence une augmentation à la fois des ARNm et de la protéine BDNF après un EX court (inférieur à 7 jours) alors que d'autres constatent seulement une élévation soit des ARNm BDNF (Gomez-Pinilla *et al.* 2001) soit de la protéine BDNF (Gomez-Pinilla *et al.* 2002; Cuppini *et al.* 2007; Ogborn *et al.* 2010; Lee *et al.* 2017; Yu *et al.* 2017). Il a également été observé une absence d'effet de l'EX voire une diminution des taux musculaires de BDNF (Jimenez-Maldonado *et al.* 2016). D'un autre côté, des auteurs suggèrent que l'augmentation des taux plasmatiques de BDNF induite par l'EX, pourrait avoir comme origine le muscle squelettique (Zoladz *et al.* 2010). Néanmoins, il est important de souligner que 90 % du BDNF circulant est stocké au niveau des plaquettes. Ces résultats contradictoires sur l'expression musculaire de BDNF induite par l'EX peuvent donc s'expliquer d'une part par ce système de séquestration plaquettaire (Kim *et al.* 2019) et d'autre part, par la présence de BDNF dans des exosomes, pouvant être relargués par le muscle (Safdar *et al.* 2016). La diversité des protocoles d'EX, des muscles analysés et le temps de sacrifice post-EX, expliquent certainement la disparité des données de la littérature. Par conséquent, d'autres études sont nécessaires afin d'évaluer l'influence du BDNF musculaire sur la plasticité cérébrale et la piste des exosomes dans la sécrétion musculaire de BDNF est un point à ne pas négliger. Malgré tout, le BDNF pourrait être considéré comme un nouveau membre de la famille des myokines.

#### **d. Les cytokines**

Les cytokines sont des glycoprotéines, comparables aux hormones, qui sont membranaires ou sécrétées suite à une stimulation. De nombreux types cellulaires sont capables de les synthétiser et elles agissent soit de manière autocrine, paracrine et/ou endocrine. Elles sont principalement classées dans les groupes : chimiokines, interférons (IFN), interleukines (IL), lymphokines et TNF. Généralement, les cytokines sont impliquées dans les processus inflammatoires, distinguant ainsi les cytokines pro- et anti- inflammatoires. Parmi les cytokines, les plus étudiées sont les IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , pro-inflammatoires et les IL-10, IL-4, TGF $\beta$  (Transforming growth factor  $\beta$ ), anti-inflammatoires.

Les données de la littérature sont inconsistantes quant aux effets des cytokines sur l'expression du BDNF induite par l'EX. L'étude de Almeida *et al.* (2013) montre que

l'augmentation des taux protéiques des cytokines TNF $\alpha$  et d'IL10 dans l'hippocampe de rats au stade postnatal P41, s'accompagne d'une élévation des taux hippocampiques de BDNF. Les auteurs mettent également en évidence, chez les rats au stade P21, une augmentation significative d'IL-6 dans l'hippocampe lors d'un EX d'intensité soutenue. Les auteurs soulignent que chez le rat au stade P41, il existe un effet dual (positif ou négatif) des cytokines sur la fonction cérébrale, puisque même si une augmentation de TNF $\alpha$  est observée, aucune altération dans le développement de l'hippocampe n'a été constaté chez les animaux. De plus, l'augmentation d'IL10 pourrait être à relier à l'augmentation du BDNF étant donné qu'une administration de BDNF stimule la production d'IL-10 et réduit l'inflammation en cas de lésion cérébrale (Noga *et al.* 2007; Spedding *et al.* 2008). Pour les animaux au stade P21, les données confortent l'hypothèse que la pratique légère de l'EX est plus bénéfique pour le développement cérébral. En effet, une augmentation à la fois du BDNF et de la prolifération cellulaire a été obtenue chez les animaux soumis à un EX de faible intensité. En fonction des modalités de l'EX, l'effet bénéfique de l'EX sur les facteurs pro-inflammatoires est divergent. Par exemple, la pratique d'un EX de haute intensité par intervalle de temps (HIIT, high intensity interval training) pendant 6 semaines chez le rat, permet de diminuer les taux des facteurs pro-inflammatoires (IL-6, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) tout en augmentant les taux hippocampiques de BDNF (Freitas *et al.* 2018). Dans un modèle de dépression induit par l'injection répétée d'IFN- $\alpha$  (rat), l'EX chronique empêche la diminution des taux corticaux et hippocampiques de BDNF observée chez les rats SED (Callaghan *et al.* 2017). En revanche, l'injection d'une endotoxine chez le rat, le LPS (Lipopolysaccharides), augmente les cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ ) et le temps de latence lors du test de la piscine de Morris. La pratique d'un EX de longue durée et d'intensité modérée (15 m/min, 30 min/j pendant 9 semaines) diminue significativement les taux d'IL-1 $\beta$  et de TNF $\alpha$  chez les animaux LPS comparés aux animaux SED traités au LPS. Malgré l'absence de mesure des taux cérébraux de BDNF, la diminution du temps de latence (Morris water maze) des animaux LPS soumis à l'EX suggère un lien entre cytokines pro-inflammatoires et la neurotrophine BDNF (Jahangiri *et al.* 2019).

En résumé, l'expression différentielle des cytokines (pro et anti-inflammatoire) en réponse à l'EX ouvre des perspectives et témoigne de la nécessité d'études complémentaires. Les réponses pro- et anti-inflammatoires induites par l'EX dépendent de plusieurs paramètres tels que le type de cytokine produite, le type cellulaire stimulé, la durée d'exposition aux cytokines, la région évaluée, les modalités de l'EX et l'âge de l'animal.

### e. Les métabolites

Depuis ces cinq dernières années, un intérêt croissant s'est porté sur l'impact des métabolites produits à la périphérie en réponse à l'EX et leur influence sur la plasticité cérébrale (Kim *et al.* 2019; Pedersen 2019). Parmi ces facteurs, on retrouve le  $\beta$ -hydroxybutyrate ( $\beta$ -HB) et le lactate, dont les actions sont décrites ci-dessous et schématisées dans la figure 18.

#### ***Le $\beta$ -hydroxybutyrate***

Le  $\beta$ -HB est un métabolite énergétique produit par le foie et issu de la synthèse des corps cétoniques en réponse à une période de jeûne ou à la suite d'un EX intense. Récemment, Sleiman *et al.* (2016) démontrent que des souris ayant accès à une roue pendant 30 jours présentent une accumulation importante de  $\beta$ -HB dans l'hippocampe. Les auteurs proposent, qu'en plus d'être une source énergétique pour le cerveau, le  $\beta$ -HB induirait l'expression cérébrale de BDNF en réponse à l'EX. Ainsi, ils montrent que la production de  $\beta$ -HB est augmentée par l'EX et que *in vitro*, des cultures de neurones corticaux ou des tranches d'hippocampes exposées à du  $\beta$ -HB surexpriment le gène *bdnf*. *In vivo*, chez la souris, une administration intraventriculaire de  $\beta$ -HB s'accompagne d'une augmentation de l'expression du gène *bdnf* dans l'hippocampe. Parallèlement, Marosi *et al.* (2016) ont mis en évidence chez la souris une corrélation positive entre les taux circulants de  $\beta$ -HB et les taux hippocampiques de BDNF induits par un EX volontaire de 6 semaines. A cet égard, certaines données démontrent même qu'un régime cétogène joue un rôle neuroprotecteur lors d'une ischémie cérébrale, de maladies neurodégénératives, et améliore la mémoire de souris âgées (Xu *et al.* 2012; Gano *et al.* 2014; Newman *et al.* 2014; Paoli *et al.* 2014; Newman *et al.* 2017). D'un point de vue mécanistique, il semblerait que l'action du  $\beta$ -HB sur l'expression cérébrale de BDNF soit médiée par l'inhibition des HDAC de classe I, point qui sera développé dans la partie suivante.

#### ***Le lactate***

Métabolite produit par le muscle en réponse à l'EX, le lactate est depuis peu, proposé comme un médiateur de la voie de signalisation du BDNF induite par l'EX. Son augmentation importante dans le sang après un EX et son passage à travers la BHE facilité par les transporteurs MCT présents sur la membrane des CEC (E *et al.* 2013) font de lui un candidat potentiel en tant qu'inducteur de l'expression cérébrale de BDNF. En effet, les travaux très récents d'El Hayek (2019) rapportent chez la souris que l'EX volontaire de 30 jours augmente

via le lactate, l'expression du gène *bdnf* dans l'hippocampe. En revanche, en bloquant les MCT (AR-C155858, antagoniste des MCT1-2), l'expression du promoteur I du gène *bdnf* est abolie. Une injection par voie intra péritonéale de lactate chez la souris, augmente dans l'heure qui suit les taux hippocampiques de BDNF et diminue le temps de latence lors du test de la piscine de Morris. Cette amélioration de l'apprentissage et de la mémoire spatiale induite par le lactate met en jeu l'activation des récepteurs TrkB par le BDNF, puisque l'injection combinée de lactate et de CEP701, un antagoniste des récepteurs TrkB, abolit l'effet. Les auteurs mettent en avant une implication des HDAC de classe III, qui sera là encore développé dans la partie suivante.

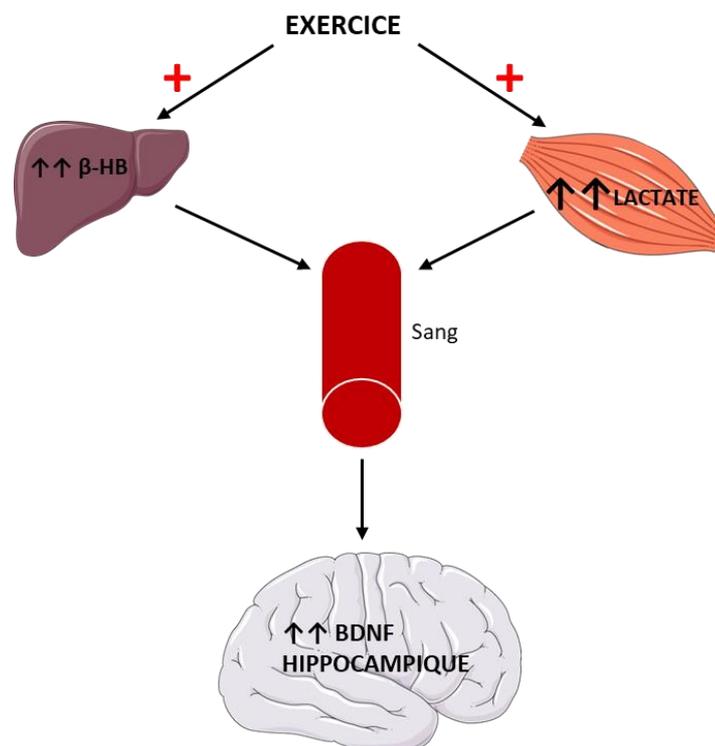


Figure 18 : Représentation de l'implication du  $\beta$ -HB et du lactate, dans la synthèse et expression du BDNF dans l'hippocampe après l'EX.

#### f. Modulateurs épigénétiques

Comme il a été évoqué précédemment, des mécanismes épigénétiques tels que la méthylation/déméthylation de l'ADN, l'acétylation/désacétylation des histones, ou encore la présence de microARN (miARN) semblent être potentiellement impliqués dans la régulation de l'expression du gène *bdnf* en réponse à l'EX.

Pour rappel, la méthylation de l'ADN est une réaction catalysée par les DNA méthyltransférases (DNMT) et consiste à ajouter un groupement méthyle en position 5 du cycle pyrimidique. C'est une modification chimique de l'ADN qui ne change pas la séquence en acides nucléiques, mais permet d'interrompre la transcription. La déméthylation de l'ADN peut être réalisée selon deux types de mécanismes, l'un dit actif au moyen d'une déméthylase et l'autre dit passif si les DNMT sont absentes ou inactives. L'acétylation/désacétylation des histones dépend de deux classes d'enzymes, les histones acétyltransférases (HAT) et les HDAC. Elles vont soit ajouter (HAT) soit retirer (HDAC) un groupement acétyle sur les lysines conservées des queues amino-terminales des histones. La charge portée par la lysine sera alors annulée lorsqu'elle est acétylée et restaurée lorsqu'elle est désacétylée. La perte de charge augmente l'accessibilité à l'ADN en réduisant sa compaction et favorise donc la transcription. Enfin, les miARN sont de courts ARN simple-brin capables de l'extinction d'un gène en s'appariant à une séquence complémentaire de l'ARNm du gène cible. Cette liaison conduit alors à la répression traductionnelle ou à la dégradation de l'ARNm.

Il est maintenant admis que la méthylation de l'ADN est un mécanisme important par lequel l'EX affecte l'expression des gènes. En effet, chez le rongeur, l'EX volontaire ou imposé, diminue l'expression des DNMT hippocampiques situées sur le gène *bdnf* (Fernandes *et al.* 2017). Concernant les mécanismes d'acétylation/désacétylation, l'EX volontaire diminue l'expression de la HDAC 5 de classe II, mais augmente l'acétylation de l'histone H3 au niveau du promoteur du transcrite IV *bdnf* (transcrit très exprimé dans l'hippocampe en réponse à l'EX) (Gomez-Pinilla *et al.* 2011; Fernandes *et al.* 2017). Dans la lignée de ces résultats, des souris soumises à un stress et ayant accès à une roue présentent une diminution de l'expression de HDAC5 mais une augmentation de l'acétylation de l'histone H3 au niveau des promoteurs des différents transcrits du BDNF (Fernandes *et al.* 2017). L'exposition de cultures primaires de neurones à du  $\beta$ -HB diminue l'activité des HDAC 2/3 (HDAC issues de la classe I) sur le promoteur du gène *bdnf*. De plus, l'inactivation de HDAC3 par un inhibiteur, le BRD3308, ou par l'utilisation d'un shRNA<sup>28</sup>, augmentent tout deux les transcrits du BDNF (Sleiman *et al.* 2016). Alors que les HDAC de classe I et II (HDAC5, HDAC2/3) semblent diminuer l'expression du gène *bdnf* (Gomez-Pinilla *et al.* 2011; Sleiman *et al.* 2016), les HDAC de classe III, notamment les sirtuines (SIRT) sont des

---

<sup>28</sup> Les short hairpin RNA sont des ARN artificiels adoptant une structure en épingle à cheveux. Ils sont utilisés pour réduire l'expression d'un gène via le phénomène d'interférence par ARN.

régulateurs positifs de l'expression du gène *bdnf* en réponse à l'EX (El Hayek *et al.* 2019). Ainsi, l'inhibition de la SIRT-1 dans l'étude d'El Hayek *et al.* (2019) par le sirtinol<sup>29</sup> ou par l'utilisation d'ARN interférents, s'oppose à l'induction du gène *bdnf* par le lactate et l'EX.

Enfin, il est connu depuis une décennie que certains miARN régulent les processus de mémoire en ciblant la voie de signalisation CREB-BDNF induite par l'EX. Les miARN-132 et 134 modulent les processus de mémoire en fonction de leur taux. En effet, les études ont montré que des taux miARN-132 trop faibles ou trop importants peuvent porter préjudice au mécanisme de mémorisation, alors qu'à l'inverse des taux modérés l'améliorent (Hansen *et al.* 2010; Hansen *et al.* 2013; Fernandes *et al.* 2017). Les miARN-134 réduisent quant à eux l'expression hippocampique de CREB et la LTP. L'EX permet également d'atténuer les effets néfastes causés par une lésion cérébrale et le vieillissement, en régulant l'expression des miARN-21 et 34. L'EX atténue de plus, les effets liés au stress en augmentant l'expression des miARN-124 impliqués dans la formation de la mémoire et la neurogenèse (Pan-Vazquez *et al.* 2015; Fernandes *et al.* 2017). Les différentes hypothèses sont résumées dans la figure 19.

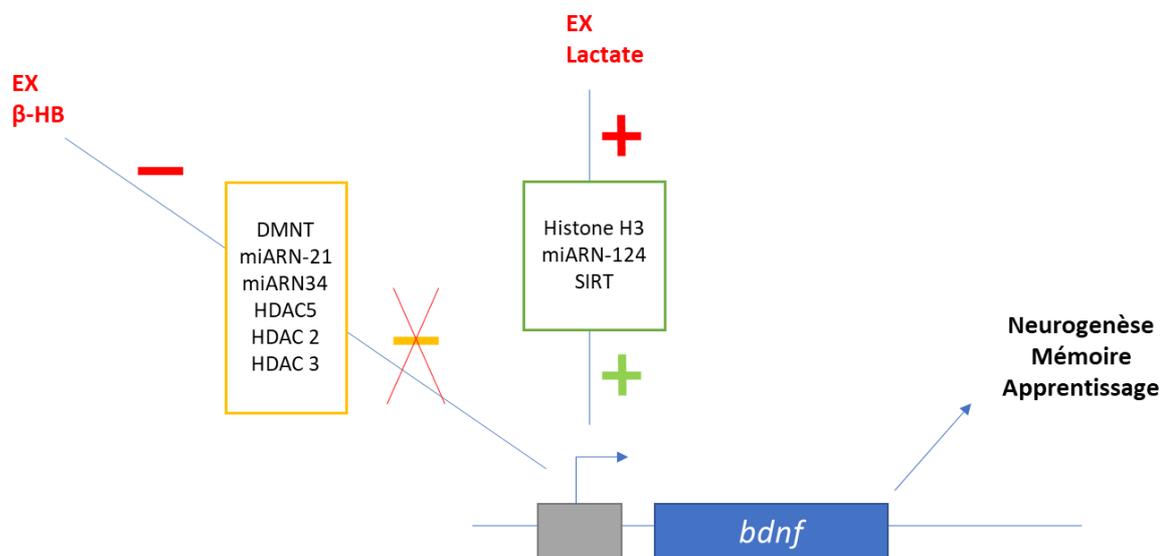


Figure 19 : Modulation de l'expression du gène *bdnf* par les facteurs épigénétiques.

En résumé de ce chapitre, les mécanismes décrits précédemment sont illustrés dans la figure 20.

<sup>29</sup> Le sirtinol est un inhibiteur des HDAC de classe III NAD<sup>+</sup> dépendantes. C'est un inhibiteur sélectif de la sirtuine.

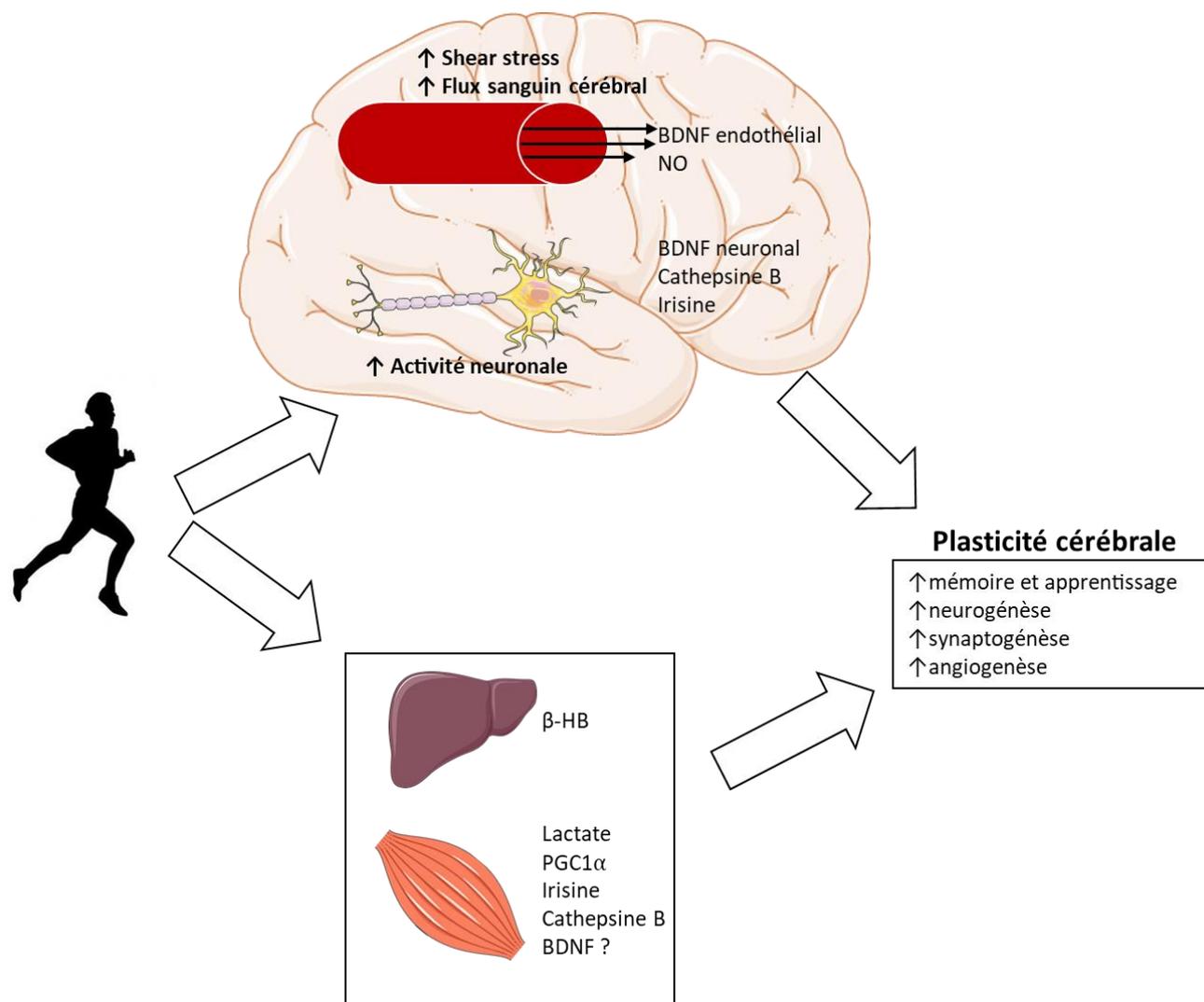


Figure 20 : Représentation du lien entre EX et augmentation de la production cérébrale de BDNF.

# *Partie 2 – Présentation des travaux*

## A. Matériels et méthodes

Lors de mes travaux de thèse, des rats ont été soumis à un protocole d'EX dont les modalités ont été étudiées, à savoir l'intensité et le type de contractions musculaires (excentrique/concentrique). Afin de répartir uniformément les animaux au sein des groupes, nous avons tout d'abord mis en place au laboratoire la mesure de la vitesse maximale aérobie (VMA). Par ailleurs, une importante partie de ma thèse a consisté à développer des tests comportementaux chez l'animal en vue d'évaluer les fonctions cognitives. L'ensemble de ces techniques sont décrites dans les parties suivantes. Les autres techniques déjà mise en place au laboratoire n'ont pas été développées ici mais elles figurent dans les sections « matériels et méthodes » des articles scientifiques présentés dans la partie 2B du manuscrit. Suite à un changement de réglementation, le protocole d'anesthésie a été modifié au cours de la thèse, plus précisément pour l'étude 4.2 de la partie 2B du manuscrit. Ainsi, une analgésie à la buprénorphine suivie d'une anesthésie avec le mélange kétamine/xylazine ont été réalisées.

### 1. Mesure de la vitesse maximale aérobie

#### *Description générale et principe*

Des études préliminaires menées au laboratoire sur l'effet de l'EX chez l'animal, ont mis en évidence une variabilité interindividuelle des capacités physiques et des taux cérébraux de BDNF au sein des groupes d'études. Ces données nous ont conduit à instaurer une stratégie permettant de répartir les animaux de manière efficace afin de limiter cette variabilité. Ainsi, nous avons évalué la VMA de nos animaux pour les répartir au sein des groupes.

Considérée comme un reflet de la  $VO_2$  max, la VMA est fréquemment utilisée chez l'Homme pour optimiser un protocole d'EX. Elle peut être mesurée de manière directe, sur un terrain de sport ou sur un ergomètre (tapis roulant, rameur, vélo) mais également de manière indirecte par calcul. Différents tests VMA sont décrits chez l'Homme et sont classifiés en deux catégories :

- Les tests en continu d'intensité stable ou progressive
- Les tests intermittents d'intensité progressive

A l'heure actuelle, les études sur l'impact de l'EX chez l'animal n'utilisent pas systématiquement la VMA pour répartir les animaux dans les groupes. Souvent la distribution aléatoire est préférée. Malgré tout, les publications ayant recours au test VMA, s'orientent principalement sur un test réalisé sur un tapis roulant, de manière continue, à allure progressive (Costa *et al.* 2012; Freitas *et al.* 2018).

### **Protocole de VMA**

Au laboratoire, nous avons opté pour un test VMA en continu, d'intensité progressive qui consiste à placer l'animal sur un tapis roulant, en position horizontale, à la vitesse de 9 m/min, ce qui correspond à une marche lente chez le rongeur. La vitesse est ensuite augmentée de 3 m/min par palier de 2 min, jusqu'à épuisement de l'animal. L'épuisement de l'animal est considéré lorsque celui-ci est dans l'incapacité de suivre le rythme de déroulement du tapis. La VMA est alors obtenue en m/min. Pour l'étude des contractions musculaires, le test VMA a été mené sur trois jours. Le 1<sup>e</sup> jour, le test a été effectué de manière classique comme décrit précédemment, et pour le 2<sup>e</sup> et 3<sup>e</sup> jour, le tapis a été incliné soit négativement soit positivement. Les animaux ont été soumis au test VMA à la fin de la période d'habituation à l'expérimentateur et au tapis roulant.

## **2. Protocole d'EX**

Les animaux sont préalablement habitués à l'expérimentateur et au tapis roulant pendant une semaine avant le début des protocoles d'EX. De manière générale, le protocole d'EX consiste en un effort sur tapis roulant d'une durée de 30 min par jour, pendant 7 jours consécutifs. L'inclinaison du tapis et la vitesse de déroulement ont été établies en fonction des études suivantes.

### **a. Étude de l'intensité de l'EX**

Pour évaluer l'impact de l'intensité de l'EX, deux intensités d'EX ont été choisies afin de réaliser soit un exercice d'intensité modérée ou soutenue. A partir des données VMA des animaux, un calcul a été établi afin que l'effort d'intensité modérée représente environ 40% de la VMA et l'effort de forte intensité représente 70-75%. Ainsi, les vitesses ont été établies pour chaque type d'EX :

- Vitesse 12 m/min : exercice modéré

- Vitesse 18 m/min : exercice soutenu

Le protocole d'EX a ensuite été réalisé sur tapis roulant en position horizontale, quel que soit l'intensité de l'EX. Dans l'étude 2 (cf. Partie 2B du manuscrit), les groupes sont définis par les abréviations suivantes :

- SED : animaux sédentaires
- EX12 : animaux exercés à 12 m/min
- EX18 : animaux exercés à 18 m/min

#### **b. Étude des contractions musculaires**

Pour l'étude des modalités de contractions excentrique/concentrique (cf. Etude 3 de la Partie 2B du manuscrit), la sollicitation cardiovasculaire était sensiblement identique pour les groupes soumis à l'EX. Autrement dit, l'intensité des efforts était d'environ 50% de la VMA. Après la réalisation des tests VMA les animaux ont été placés de façon aléatoire dans les groupes suivants :

- SED : animaux sédentaires
- HOR : animaux soumis à un EX sur tapis en position horizontale, à la vitesse de 14 m/min
- UP : animaux soumis à un EX sur tapis en position inclinée positivement de 5%, à la vitesse de 12 m/min
- DOWN : animaux soumis à un EX sur tapis en position inclinée négativement de 10%, à la vitesse de 14 m/min

### **3. Tests comportementaux**

Durant ma thèse, j'ai également mis en place des tests comportementaux chez le rat. Trois tests ont été entrepris afin d'évaluer d'une part la mémoire, et d'autre part, l'anxiété et la locomotion des animaux. La scopolamine, un antagoniste des récepteurs muscariniques, à l'origine d'une amnésie transitoire chez l'animal (Klinkenberg *et al.* 2010), a été utilisée durant ces tests.

#### **a. Test de reconnaissance d'objet**

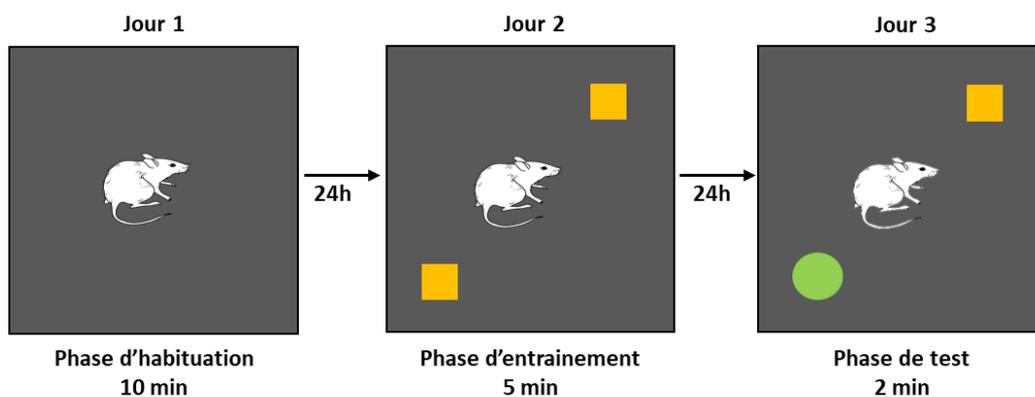
*Description générale et principe*

Comme évoqué dans la première partie du manuscrit, le test de reconnaissance d'objet a été décrit par Ennaceur *et al.* (1988) pour évaluer la mémoire de reconnaissance chez le rongeur.

### **Protocole du laboratoire**

Le test est réalisé dans une enceinte plastique noire avec un fond en bois aggloméré, de couleur grise dont les dimensions sont 60 x 60 x 40 cm. Cette couleur a été choisie afin d'obtenir un contraste suffisant avec la couleur de l'animal (rat blanc) lors de l'enregistrement vidéo des séquences de test pour l'analyse. L'habitable est placé dans une pièce à faible illumination constante (45 Lux) et isolée des nuisances sonores. Nous avons utilisé la forme classique du test, se déroulant en trois phases, chacune espacée de 24h (Figure 21) :

- Phase 1 : phase d'habituation (Jour 1)
- Phase 2 : phase d'entraînement (Jour 2)
- Phase 3 : phase de test (Jour 3)



**Figure 21 : Représentation du test de reconnaissance d'objet.**

La phase d'habituation (Jour 1) consiste à placer l'animal dans l'enceinte vide pendant 10 min afin que celui-ci se familiarise à l'environnement nouveau du test. Cette étape est nécessaire et peut être répétée afin de réduire le stress de l'animal. Après 24h, il est de nouveau placé dans l'enceinte, mais en présence de deux objets identiques durant 5 min : c'est la phase d'entraînement. Les objets sont placés en diagonales (27.5 cm entre chaque objet), à distance égale des angles de l'enceinte (20 cm) afin de permettre une circulation sans entrave de l'animal. Enfin, 24h après la phase d'entraînement, l'animal est soumis à la phase de test qui consiste à le mettre en présence de deux objets différents pendant 2 min. Durant cette phase,

il est en présence d'un objet qu'il a déjà vu lors de la phase 2 et d'un nouvel objet. Ces objets sont placés à la même distance que lors de la phase d'entraînement, et sont inversés entre chaque passage afin d'éviter que des repères spatiaux puissent biaiser l'étude.

Le choix de l'objet familier dépend d'abord de la taille de l'animal, puisqu'il faut que celui-ci le remarque, et soit donc de taille suffisante. Ensuite, le choix de l'objet nouveau doit dépendre de l'encombrement stérique qui doit être similaire à celui de l'objet familier. Toutefois, l'objet nouveau doit être de matière, de texture, de forme et de couleur différentes de l'objet familier pour que l'animal perçoive distinctement une différence.

Les phases d'entraînement et de test sont enregistrées à l'aide d'une caméra (GoPro Hero) placée juste au-dessus de l'enceinte. La mesure du temps d'exploration est ensuite réalisée à partir des vidéos prises, en double aveugle. L'exploration est considérée significative lorsque l'animal renifle, touche, ou présente sa tête dans la direction de l'objet à moins de 2 cm de celui-ci. L'enceinte et les objets sont soigneusement nettoyés avec de l'éthanol 70% entre chaque passage des animaux pour limiter les repères odorants et le stress.

Ce test a été réalisé chez l'animal en présence et en absence de scopolamine. Les animaux ont reçu deux injections par voie intra-péritonéale, à la dose de 1mg/kg, 60 min après la phase 2 et 60 min avant la phase 3 du test.

## **b. Test d'enfouissement des billes**

### ***Description générale et principe***

Le test d'enfouissement des billes, du terme anglais « marble burying test (MBT) » a été découvert et mis au point chez la souris (Njung'e *et al.* 1991) puis adapté chez le rat (Skelton *et al.* 2009). Il permet d'évaluer le comportement de type anxieux chez le rongeur en se basant sur la tendance naturelle du rongeur à enfouir les stimuli menaçants qu'il rencontre. Contrairement aux tests classiques, fondés principalement sur l'exploration d'un nouveau dispositif (openfield<sup>30</sup>), l'animal est placé dans un environnement familier mais en présence d'un stimulus aversif, ici, des billes. L'impact de molécules anxiolytiques ou à l'inverse anxiogènes, est souvent étudié avec ce test. Généralement, il est réalisé dans une cage standard de rongeurs, remplie de litière propre où des billes sont stratégiquement déposées à la surface de cette litière. La mesure du niveau d'anxiété est alors obtenue par comptabilisation

---

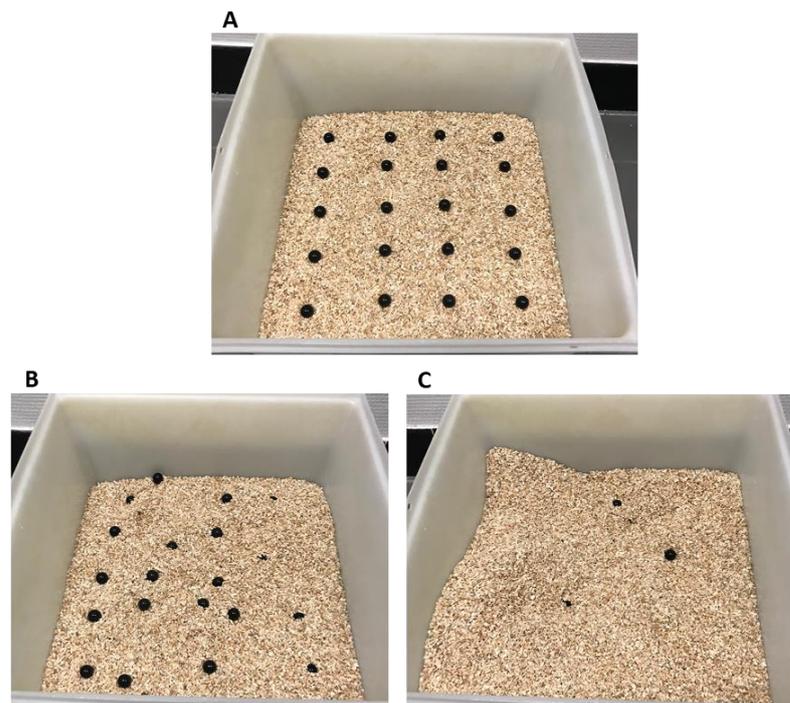
<sup>30</sup> L'openfield est un test utilisé pour évaluer l'activité basale des rongeur et son évolution en réponse à la nouveauté.

du nombre de billes enfouies ou non dans la sciure. Classiquement considérée comme une molécule anxiolytique, nous avons réalisé ce test pour vérifier les propriétés de la scopolamine combinée ou non à l'EX.

### ***Protocole du laboratoire***

Ce test est réalisé dans une cage standard de rat (taille : 40 x 36 x 16 cm), remplie de sciure propre à une hauteur suffisante (environ 6-8 cm) pour un enfouissement optimal des billes par l'animal. Vingt billes de taille standard sont placées à la surface de la sciure, réparties en 4 colonnes de 5 billes à distance égale (Figure 22A).

L'animal est placé dans la cage contenant les billes et laissé seul dans une pièce sombre pendant 30 min. A la fin du temps, l'animal est remis dans sa cage de stockage et le nombre de billes enfouies ou non est comptabilisé (Figure 22B et C). Une bille est considérée enfouie lorsque celle-ci est complètement recouverte ou au 2/3 de sciure (Figure 22C). Entre chaque passage, les cages et les billes sont lavées à l'éthanol 70%, et la sciure changée.



**Figure 22 : Test d'enfouissement des billes après passage de l'animal.**

(A) Représentation du test d'enfouissement de billes. (B) L'image de gauche représente le passage d'un animal non anxieux dans la cage, puisque les billes n'ont pas été enfouies dans la sciure. (C) L'image de droite illustre un état anxieux de l'animal puisqu'après son passage, la majorité des billes ont été enfouies dans la sciure.

### c. Test de locomotion

#### *Description générale et principe*

L'actimétrie permet d'étudier l'activité locomotrice spontanée de l'animal après administration d'un traitement pharmacologique ou d'une chirurgie. Dans notre cas, nous avons observé si l'injection de scopolamine pouvait avoir un impact sur la locomotion des animaux. En effet, l'injection de scopolamine au préalable peut provoquer un stress chez l'animal et limiter ses mouvements.

#### *Protocole du laboratoire*

L'animal est placé dans une « chambre » carrée de locomotion, de dimensions 36 x 36 x 16 cm, constituée de deux capteurs infra-rouge situés sur les côtés opposés de la chambre. Le système de cellules photoélectriques infra-rouge est relié à un générateur comptabilisant le passage de l'animal devant les cellules photoélectriques. Pendant 5 min l'animal est placé dans cette chambre et le nombre de passages représentant la locomotion de celui-ci est comptabilisé.

## B. Publications scientifiques

- I. Etude 1 : Première publication – Réponse uniforme du Brain-derived neurotrophic factor d'origine artériel et veineux à un exercice sur tapis roulant chez le rat mâle

**Titre:**

Uniform response of arterial and venous brain-derived neurotrophic factor to treadmill exercise in male rats

**Auteurs:**

Marina Cefis, Aurore Quirié, Nicolas Pernet, Christine Marie, Philippe Garnier, Anne Prigent-Tessier

**Journal:**

Soumise dans Journal of Applied Physiology (2019)

## Résumé des travaux

### a. Contexte

Alors que le BDNF a récemment été identifié comme un acteur clé de la physiologie vasculaire, peu de données concernent sa production vasculaire au niveau des vaisseaux périphériques et la régulation de son expression en réponse à l'EX. Dans ce contexte, les expressions vasculaires de la voie BDNF/TrkB et du NO ont été étudiées dans des vaisseaux périphériques en conditions basale et stimulée par l'EX, stratégie non médicamenteuse reconnue pour ces effets bénéfiques sur la santé cardiovasculaire et pour stimuler la production de BDNF.

### b. Objectifs

Les objectifs de cette étude étaient 1) d'évaluer l'expression du BDNF dans des vaisseaux de même territoire vasculaire mais de fonction distincte (artère vs veine), 2) de caractériser le type cellulaire à l'origine de l'expression du BDNF dans ces vaisseaux, et enfin 3) d'étudier l'impact de l'EX, utilisé comme stratégie pour stimuler l'expression de BDNF dans l'artère et la veine en lien avec la production de NO.

### c. Protocole expérimental

Les expériences ont été menées sur des rats mâles adultes de la souche WISTAR, SED ou soumis à un protocole d'EX sur tapis roulant en position horizontale, d'une durée de 30 min/jour, à la vitesse de 18 m/min, pendant 7 jours consécutifs. L'aorte abdominale et la veine cave inférieure ont été prélevées, respectivement 2h ou 24h après la dernière session d'EX pour évaluer les taux d'ARNm BDNF, eNOS (RT-qPCR) et les taux protéiques de BDNF, p-TrkB<sup>Tyr816</sup>, eNOS et p-eNOS<sup>Ser1177</sup> (WB). Les localisations cellulaires de BDNF et de ses récepteurs TrkB activés (TrkB<sup>Tyr816</sup>) ont été appréciées par la technique d'immunofluorescence.

### d. Principaux résultats

Les résultats mettent en évidence que :

En condition basale, l'expression protéique de BDNF est significativement plus importante dans l'aorte que dans la veine. L'étude de la localisation cellulaire montre que la CE et la CMLV expriment toutes les deux du BDNF quel que soit le vaisseau étudié. Néanmoins, le

marquage du BDNF est plus intense au niveau de l'endothélium des vaisseaux qu'au niveau de la média.

En réponse à l'EX, les expressions protéiques de BDNF, p-TrkB<sup>Tyr816</sup>, eNOS et p-eNOS<sup>Ser1177</sup> sont significativement augmentées dans les deux vaisseaux étudiés.

Enfin, les données issues de la méthode d'immunofluorescence montrent une association positive entre les expressions endothéliales de BDNF et de p-TrkB<sup>Tyr816</sup> en réponse à l'EX, à la fois dans l'aorte et la veine.

### Conclusion de l'étude

Cette étude met en évidence que le BDNF est exprimé par les vaisseaux périphériques avec une proportion prédominante dans l'endothélium comparé au muscle lisse. L'EX conduit à une réponse similaire de la part des deux vaisseaux étudiés, que ce soit pour le BDNF ou l'activation des récepteurs TrkB. Ces données suggèrent que le BDNF endothélial pourrait être inclus dans la longue liste des facteurs dérivés de l'endothélium contrôlés par l'EX. D'autres études sont cependant requises pour explorer le rôle du BDNF endothélial dans les bénéfices vasculaires induits par l'EX.

1           **UNIFORM RESPONSE OF ARTERIAL AND VENOUS BRAIN-DERIVED**  
2           **NEUROTROPHIC FACTOR TO TREADMILL EXERCISE IN MALE RATS**

3

4   Running title: arterial and venous BDNF

5

6   Marina Cefis<sup>1</sup>, Aurore Quirié<sup>1</sup>, Nicolas Pernet<sup>1</sup>, Christine Marie<sup>1</sup>, Philippe Garnier<sup>1,2</sup>, Anne  
7   Prigent-Tessier<sup>1</sup>

8

9   <sup>1</sup>INSERM UMR1093-CAPS, Université Bourgogne Franche-Comté, UFR des Sciences de  
10   Santé, F-21000, Dijon, France

11   <sup>2</sup>Département Génie Biologique, IUT, F-21000, Dijon, France

12

13   Corresponding author:

14   Christine Marie

15   INSERM UMR1093-CAPS,

16   UFR des Sciences de Santé, 7 boulevard Jeanne d'Arc, 21079 Dijon Cedex, France.

17   Tel: (33) 3 80 39 32 25

18   Email address: christine.marie@u-bourgogne.fr

19

20   **NEW & NOTEWORTHY** : This study shows that aerobic treadmill exercise in rats induced  
21   a strong overexpression of BDNF in endothelial cells but not in muscular cells and that this  
22   effect did not differ between artery and vein from a same territory. BDNF overexpression  
23   coincided with increased activation of endothelial nitric oxide synthase and phosphorylation of  
24   TrkB receptors. These new data identify BDNF as a full endothelium-derived factor and support  
25   the involvement of endothelial BDNF in exercise-induced vascular benefits.

## ARTERIAL AND VENOUS BDNF

26 **ABSTRACT**

27           Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) has been recently identified as a new actor  
28 in vascular physiology. While exercise (EX) benefits cardiovascular health, little is known on  
29 the effect of EX on vascular BDNF. Therefore, the present study investigated vascular BDNF  
30 expression, localization and response to EX in rats. Artery and vein from a same territory  
31 (abdominal aorta and vena cava) were collected in rats either sedentary (SED) or subjected to  
32 EX (a 30 min-daily treadmill activity, 18 m/min for a week). BDNF (protein, mRNA), its  
33 tropomyosin related kinase receptor (TrkB) phosphorylated at tyrosine 816 (p-TrkB<sup>Tyr816</sup>,  
34 protein) and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) either phosphorylated at serine 1177  
35 (protein) or unphosphorylated (protein, mRNA) were measured by RT-qPCR and Western blot  
36 while localization of BDNF and p-TrkB<sup>Tyr816</sup> was determined by immunofluorescence analysis.  
37 In SED rats, protein BDNF levels were higher in arterial than in venous wall, while mRNA  
38 levels did not differ. These data coincided with higher BDNF staining in both endothelial and  
39 smooth muscle cells of artery. However, muscular staining was negligible as compared to  
40 endothelial BDNF staining. EX resulted in an increase (+ 50%) in arterial and venous BDNF  
41 and p-TrkB<sup>Tyr816</sup> protein levels, a non-significant variation in BDNF mRNA levels and a  
42 selective overexpression of BDNF (x4) in endothelium of both vessels. Finally, endothelial  
43 BDNF expression correlated with endothelial p-TrkB<sup>Tyr816</sup> expression, a marker of TrkB  
44 activation by BDNF. The results incite to consider endothelial BDNF as a full endothelium-  
45 derived factor and emphasize endothelial BDNF as an attractive actor in the vascular benefits  
46 of exercise.

47

48 **Key words:** BDNF, endothelium, artery, vein, exercise

49

## ARTERIAL AND VENOUS BDNF

## 50 INTRODUCTION

51 The neurotrophin brain-derived neurotrophic factor (BDNF) was discovered in the brain  
52 where activity-dependent release of neuronal BDNF plays a key role in neuroplasticity,  
53 learning, memory and cognition through phosphorylation at tyrosine 816 of neuronal full-length  
54 (FL) tropomyosin related kinase receptor (p-TrkB<sup>Tyr816</sup>) (17). However, cultured endothelial  
55 cells, either cerebral or peripheral, express and secrete BDNF under a bioactive form (1, 10,  
56 13). It was even reported that the rate of constitutive BDNF secretion by cultured endothelial  
57 cells was 50 times higher than that of cultured neurons (6). More intriguingly, the rat adult  
58 cardiovascular system (aorta and heart) contains as much BDNF as the brain (24) supporting  
59 the notion that endothelial-derived BDNF contributes to the regulation of cardiovascular  
60 function. Consistently, endothelial cells express FL-TrkB receptors and exposure to exogenous  
61 BDNF of cultured endothelial cells or isolated vessels was reported to induce angiogenesis (2,  
62 12, 32), inhibit leukocytes adhesion (30), increase resistance to pro-apoptotic stimuli (29) and  
63 induce relaxation (15, 24, 31). *In vivo*, TrkB activation has also been suspected to protect  
64 against atherosclerosis and coronary artery disease (7) while decreased endothelial BDNF  
65 expression results in a greater propensity to arterial thrombosis (27).

66 Exercise (EX) is one of the most efficient strategies to improve cardiovascular health,  
67 likely as a result of fluid shear stress (FSS)-dependent increase in endothelial nitric oxide (NO)  
68 production. Indeed, NO is an endothelium-derived relaxant factor that also protects against  
69 vascular inflammation and atherogenesis (28). Our laboratory revealed that EX resulted in  
70 endothelial BDNF overexpression not only in the cerebral microvasculature (25) but also in  
71 peripheral conduit artery (24). Furthermore, we showed that spontaneously hypertensive rats  
72 exhibited low aortic BDNF levels as compared to normotensive rats and that EX alleviated the  
73 decrease (24). Given that NO and BDNF share common vascular effects, it is tempting to  
74 suggest that some effects of NO are BDNF-dependent and by extension that endothelial BDNF

## ARTERIAL AND VENOUS BDNF

75 synthesis is controlled *in vivo* by endothelium-derived NO as suspected from *in vitro*  
76 experiments (14, 16, 22). However, *in vitro* experiments do not fully replicate *in vivo*  
77 conditions. Moreover, while BDNF was detected in cultured vascular smooth muscle cells  
78 (VSMC) (4, 20), endothelial and muscular BDNF expressions have never been simultaneously  
79 investigated. Furthermore, studies designed to compare vascular BDNF in artery vs vein are  
80 lacking, while both the arterial and venous components of blood circulation benefit from EX.

81 The objective of the present study was to investigate vascular BDNF levels (protein and  
82 mRNA), localization and response to EX in rats. For this purpose, artery and vein of a similar  
83 territory (abdominal aorta and vena cava) were collected in rats either sedentary (SED) or  
84 subjected to daily (30 min) treadmill activity for 7 consecutive days. To assess the potential  
85 autocrine effect of endothelial BDNF and the role of NO in the control of BDNF synthesis, we  
86 also investigated the relationship between endothelial BDNF and p-TrkB<sup>Tyr816</sup> expressions or  
87 endothelial NO synthase phosphorylated at serine 1177 (p-eNOS<sup>Ser1177</sup>) expression.

88

**89 MATERIAL AND METHODS**

90

*91 Animals*

92 Experiments were carried out on 8 week-old male Wistar rats (n = 72) purchased from  
93 Janvier (Le Genest Saint Isle, France), conducted according to the french Department of  
94 Agriculture guidelines (approval number R-21UB/EPHE-F1-11) and approved by the local  
95 ethic committee (agreement 105). All experimental procedures were performed in compliance  
96 with ARRIVE guidelines. The animals were housed five per cage, kept under a 12/12 light/dark  
97 cycle with an *ad libitum* access to food and water.

98

*99 Induction of exercise*

## ARTERIAL AND VENOUS BDNF

100 After an adaptation period (five days) of all rats to experimenters and treadmill  
101 apparatus as previously described in details (25), animals were then randomized in SED and  
102 EX groups (n = 36 each). Rats of EX group were trained 30 min/day in the morning at 18 m min<sup>-1</sup>  
103 (~75% of maximal aerobic speed) (21) for 7 consecutive days using the same treadmill. SED  
104 rats were kept in their own cage at the vicinity of the treadmill apparatus.

105

*106 Collection and preparation of vessel samples*

107 After anaesthesia with chloral hydrate (400 mg kg<sup>-1</sup>, i.p., Sigma-Aldrich) and a  
108 transcardiac perfusion with saline to remove blood from the vasculature, the abdominal aorta  
109 and vena cava were carefully isolated in each rat. Vessels were collected either 2 h (for RT-  
110 qPCR analysis) or 24 h (for Western blotting and immunofluorescence analyses) after the last  
111 session of treadmill exercise.

112 For RT-qPCR, isolated vessels were successively stored at +4°C (24 h), -20°C (24 h) in  
113 RNA stabilization solution (ref. 76104, Qiagen). Then, the stabilization solution was removed  
114 before storage of vessels at -80°C. Total RNA were extracted from vessels using the RNeasy  
115 Fibrous Tissue Mini kit (ref. 74704, Qiagen) and RNA concentration was determined using  
116 NanoDrop technology.

117 For Western blotting analysis, once isolated, vessels were immediately kept at -80°C  
118 until homogenization in 5 volumes of ice-cold lysis buffer [100 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 7.4),  
119 150 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl, 1 mmol·L<sup>-1</sup> Ethylene Glycol Tetraacetic Acid, 1% triton X-100, 1%  
120 protease inhibitor cocktail (P8340, Sigma-Aldrich), and 1% phosphatase inhibitor cocktail  
121 (1066-8304, Fischer Scientific)] using ultra Turrax OMNI TH (1 min) and sonication (15 s).  
122 Homogenates were then centrifuged (20 min at 12 000 g, 4°C) and protein concentration was  
123 determined in supernatant using the Lowry method.

## ARTERIAL AND VENOUS BDNF

124 For immunofluorescence analysis, once isolated, vessels were immediately embedded  
125 in OCT (CryoMatrix, 6769006, ThermoShandon) and kept at -80°C until preparation of slices  
126 (10 µm-thickness, cryostat MM550 OPV MicromMicrotech, Francheville, France). Slices were  
127 collected on SuperFrost plus slides and stored at -80°C.

128

129 *Investigation of the link between vascular BDNF levels and endothelial NO production*

130 The comparison between vascular BDNF levels in abdominal aorta vs. vena cava in  
131 baseline conditions (vessels with different internal diameter and exposed to the same blood flow  
132 and consequently to different FSS) as well as the comparison of the effect of EX on arterial and  
133 venous BDNF levels (each exercise bout results in a similar increase in blood flow in abdominal  
134 aorta and vena cava) offered us the opportunity to investigate whether vascular BDNF levels  
135 mirrors endothelial NO production. Indeed, endothelial NO production is mainly dependent on  
136 FSS since FSS induces a magnitude-dependent induction of eNOS phosphorylation at serine  
137 1177 (34). Importantly, in phosphorylated form, eNOS produces 10 more times NO than the  
138 unphosphorylated form (3).

139

140 *Reverse Transcriptase Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction*

141 After quantification, 300 ng of RNA were reversely transcribed (5 min at 25°C, 1 h at  
142 42°C, 5 min at 85°C, 4°C) using iScript reverse transcription supermix (BIO-RAD  
143 Laboratories, Ivry sur Seine, France). As described in Table 1, sequences of *bdnf*, *eNOS*  
144 (endothelial NO synthase) and housekeeping *hpri* (hypoxanthine phosphoribosyl-transferase)  
145 genes were obtained from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database  
146 while the primer sequences (Eurogentec, Angers) were designed using Primer-Basic Local  
147 Alignment Search Tool (Primer-BLAST, RRID:SCR\_003095). Real-Time PCR and

6

## ARTERIAL AND VENOUS BDNF

148 quantification of gene expressions were performed as previously described (16). The relative  
149 transcription level of the gene was calculated using the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method.

150

151 *Western blotting*

152 Equal protein amounts were resolved on 8 to 15% SDS-PAGE and transferred using  
153 Turbo Transblot technology (ref. 1704150, BIO-RAD Laboratories, Ivry sur Seine, France) to  
154 polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes. After blockade of non-specific binding sites,  
155 overnight in Tris Buffer Saline - Tween 20 (0.1%) (TBS-T) containing 7.5% of BSA for eNOS,  
156 p-eNOS<sup>Ser1177</sup> and p-TrkB<sup>Tyr816</sup>, or 5% of non-fat dry milk for BDNF and  $\beta$ -actin proteins,  
157 PVDF membranes were incubated in solution containing primary antibody directed against  
158 BDNF (rabbit monoclonal antibody, Abcam Cat# ab108319, RRID:AB\_10862052, 1:3000 in  
159 TBS-T + 5% of non-fat dry milk), p-trkB<sup>Tyr816</sup> (rabbit polyclonal antibody, Millipore Cat#  
160 ABN1381, RRID:AB\_2721199, 1:1000 in TBS-T + 10% of BSA), eNOS (mouse monoclonal  
161 antibody, BD Biosciences Cat# 610297, RRID:AB\_397691, 1:2500 in TBS-T), p-eNOS<sup>Ser1177</sup>  
162 (mouse monoclonal antibody, BD Biosciences Cat# 612393, RRID:AB\_399751, 1:1000 in  
163 TBS-T + 10% of BSA) or  $\beta$ -actin (Sigma-Aldrich Cat# A5441, RRID:AB\_476744, 1:10000 in  
164 TBS-T) for 3 h at room temperature (RT). Then, PVDF membranes were incubated (RT) in  
165 TBS-T containing secondary antibodies conjugated with horseradish peroxidase anti-IgGs (  
166 anti- rabbit, Jackson ImmunoResearch Labs Cat# 111-035-144, RRID:AB\_2307391, and anti-  
167 mouse, Jackson ImmunoResearch Labs Cat# 115-035-166, RRID:AB\_2338511, 1:30000 to  
168 1:50000 according to the protein) for 1 h 30. Protein-antibody complexes were visualized using  
169 the enhanced chemiluminescence western blotting detection system (ECL 2, 1151-7371, Fisher  
170 Scientific) and revealed on chemiluminescent film (Amersham Hyperfilm ECL, 28906837, GE  
171 Healthcare) in developer (P7042-5GA, Sigma Aldrich) and fixer (P7167-5GA, Sigma Aldrich)  
172 solution baths. The non-crop immunoblots of each protein are presented in Figure 1 of

7

## ARTERIAL AND VENOUS BDNF

173 supplemental data. The molecular weight scale used for the experiment was the Protein ladder  
174 Plus prestained (#06P-0211, Euromedex). The band density (Optical density values) was  
175 determined using a GS-800 apparatus (BIO-RAD Laboratories, Ivry sur Seine, France) and  
176 analyzed with ImageLab software ([http://www.bio-rad.com/en-us/sku/1709690-image-lab-](http://www.bio-rad.com/en-us/sku/1709690-image-lab-software)  
177 [software](http://www.bio-rad.com/en-us/sku/1709690-image-lab-software), RRID:SCR\_014210). Artery and vein from SED rats were simultaneously analyzed  
178 on the same gel in order to compare protein expression between these vessels in baseline  
179 conditions. Vessels (either artery or vein) of SED and EX rats were simultaneously analysed  
180 on the same gel in order to investigate the effect of exercise on protein expression. Importantly,  
181 the amount of protein required to detect the protein of interest results in a signal that far exceeds  
182 the linear dynamic range when detecting  $\beta$ -actin, thereby eliminating the usefulness of  $\beta$ -actin  
183 for the normalization of western blots. Thus,  $\beta$ -actin was used here as an internal standard only,  
184 to verify that proteins were indeed loaded on the gel. The appropriate amounts of total proteins  
185 to be analyzed were previously determined from concentration (increasing amounts of  
186 proteins)/response (optical density of the band) curves from two rats both belonging to a  
187 particular group (on the same gel) or from the two vessels belonging to a same rat. All gels  
188 were run in triplicate and data were calculated from a representative gel rather than averaged  
189 data, thus allowing not only to display corresponding immunoblots but also to perform an  
190 appropriate statistical analysis (6 samples/group for analysis of a representative gel instead and  
191 18 samples/group for analysis of averaged data, whilst number of rats/group is 6).

192

193 *Immunofluorescence*

194 Slices were fixed with acetone before blockade of non-specific binding sites with TBS  
195 (20 mmol L<sup>-1</sup> Tris/HCl, 137 mmol L<sup>-1</sup> NaCl, pH 7.4) containing 5% Goat Serum (GS), 0.1%  
196 Triton X100, 0.2% Tween 20. Then, they were incubated with TBS containing 2% GS, 0.01%  
197 Triton X100, 0.02% Tween 20 and antibody against BDNF (1:200, rabbit monoclonal, Abcam

8

## ARTERIAL AND VENOUS BDNF

198 Cat# ab108319, RRID:AB\_10862052) or p-TrkB<sup>Tyr816</sup> (1:100, rabbit polyclonal, Millipore Cat#  
199 ABN1381, RRID:AB\_2721199) in the presence of antibody directed against von Willebrand  
200 Factor (vWF), a specific endothelial cell marker (1:100 mouse monoclonal, 142828, US  
201 biological). They were then exposed to fluorescent secondary antibodies [ALEXA Fluor 488  
202 (1:800, anti-mouse, A-11029, Thermo Fisher Scientific Cat# A-11029, RRID:AB\_2534088)  
203 and 568 (1:800, anti-rabbit, Thermo Fisher Scientific Cat# A-11036, RRID:AB\_10563566)]  
204 diluted in TBS containing 2% GS. Finally, samples were mounted with a fluorescent mounting  
205 solution containing 1.5 µg/mL of DAPI (Vectashield, FPDT094A, Interchim) used as a nuclear  
206 marker and analysed using an epifluorescent microscope (Eclipse E600, Nikon France S.A.S.,  
207 Champigny-sur-Marne, France). Intensity of staining was quantified using an automated  
208 method with Image J software (<https://imagej.net/>, RRID:SCR\_003070). The calculated  
209 fluorescence intensity corresponded to the mean of intensity obtained by plotting a line through  
210 adjacent endothelial or vascular smooth muscle cells. The analysis was performed by two  
211 experimenters blinded from experimental conditions.

212

*Statistical analysis*

214 SigmaPlot 11.0 software (<http://www.sigmaplot.com/products/sigmaplot/>,  
215 RRID:SCR\_003210) was used for all graphs and statistical analysis. Data were expressed as  
216 means ± standard deviations (SD). Comparison between artery and vein from the same rat was  
217 performed using a parametric or non-parametric paired-test, depending on the normality and  
218 equal variance tests. Comparison between SED and EX groups was performed using a  
219 parametric *t* test or non-parametric Mann–Whitney test, depending on the normality and equal  
220 variance tests. Spearman correlation was used to measure the strength of the relationship  
221 between paired data. A p-value of < 0.05 was considered statistically significant.

222

## ARTERIAL AND VENOUS BDNF

223 **RESULTS**

224

225 *Arterial vs venous BDNF in sedentary rats*

226 The results (Figure 1) showed that artery and vein contained BDNF protein and mRNA  
227 and that BDNF protein levels were higher in artery than in vein in SED rats (Figure 1A) while  
228 no difference in BDNF mRNA levels was observed between these two vessels (Figure 1B).  
229 Immunofluorescence analysis revealed a strong BDNF staining by cells positive for the  
230 endothelial cell marker vWF (Figure 1C, insert). This staining was uniform throughout the  
231 endothelium and higher for the artery than for the vein ( $p = 0.011$ ). Notably, in conditions at  
232 which endothelial expression was easily detectable, it was impossible to detect BDNF in the  
233 media. In fact, detection of BDNF in vascular smooth muscle cells (VSMC, cells positive for  
234 alpha actin) required longer exposure time of the slices for the same field of view. In these  
235 specific experimental conditions, a faint and scattered BDNF staining was observed throughout  
236 the media. However, while specifically focusing on this area (media), we noticed that arterial  
237 VSMC exhibited higher intensity of BDNF staining than venous VSMC ( $3.67 \pm 0.56$  vs  $1.68 \pm$   
238  $0.53$  arbitrary units,  $p < 0.001$ , data not shown). Collectively, these data indicated that the higher  
239 BDNF content of the arterial wall as compared to the venous wall related to a higher BDNF  
240 expression by both endothelial cells and VSMC of artery especially since the media is thicker  
241 for artery than for vein from a similar territory.

242

243 *Effect of exercise on arterial and venous BDNF production*

244 The effects of exercise (EX) on BDNF production are summarized in Figure 2. As  
245 regards the effect on artery (Figure 2A, 2B, 2C), EX rats exhibited significant higher levels of  
246 BDNF protein than SED rats (Figure 2A) without associated significant changes in BDNF  
247 mRNA levels (Figure 2B). Increased BDNF protein levels in response to exercise coincided

10

## ARTERIAL AND VENOUS BDNF

248 with increased BDNF staining (~ x4) in endothelial cells only (Figure 2C). Indeed, BDNF  
249 expression in arterial VSMC was not different between SED and EX rats (not shown). A similar  
250 effect of exercise was observed on vein (Figure 2D, 2E, 2F). Thus, EX resulted in increased  
251 BDNF protein levels (Figure 2D), no change in BDNF mRNA levels (Figure 2E) and  
252 endothelial overexpression (x4) of BDNF (Figure 2F). Again, no difference in venous VSMC  
253 BDNF expression was observed between SED and EX rats (not shown).

254

*255 Association between endothelial BDNF expression and TrkB activation*

256 Full length TrkB receptors (FL-TrkB) and truncated TrkB receptors (t-TrkB), which are  
257 devoid of tyrosine activity, are both present in vessels (20, 31) (Figure 1 in supplemental data).  
258 However, in term of cellular localization, endothelial cells and VSMC prominently express FL-  
259 and t-TrkB receptors, respectively. Therefore, BDNF secretion by endothelial cells was  
260 assessed from staining intensity of endothelial p-TrkB<sup>Tyr816</sup>, an indicator of TrkB activation by  
261 endogenous BDNF. As shown in Figure 3, EX resulted in a comparable augmentation (x3) of  
262 activated TrkB expression in artery (Figure 3A) and vein (Figure 3B). When endothelial BDNF  
263 expression in both SED and EX rats was plotted against endothelial p-TrkB<sup>Tyr816</sup> expression, a  
264 positive association was observed for aorta (Figure 3C) and vena cava (Figure 3D). The  
265 association was not observed when SED and EX rats were examined separately (not shown).  
266 Of note, results from western blot analysis of vascular p-TrkB<sup>Tyr816</sup> corroborated  
267 immunohistochemical data. Indeed, EX induced a significant augmentation of p-TrkB<sup>Tyr816</sup>  
268 protein levels either in artery or in vein (Figure 3E and F).

269

*270 Endothelial BDNF expression reflects endothelial NO production*

271 In order to investigate the link between endothelial BDNF expression and NO  
272 production, vascular p-eNOS<sup>Ser1177</sup>, eNOS protein and eNOS mRNA levels were compared in

## ARTERIAL AND VENOUS BDNF

273 vein vs artery of SED rats and in SED vs EX rats. The results are summarized in Table 2 and  
274 presented in details in Figure 2 of supplemental data. In SED rats (up part of Table 2), p-  
275 eNOS<sup>Ser1177</sup> and eNOS protein levels did not differ between artery and vein. On the contrary,  
276 eNOS mRNA was lower in aorta than in vena cava ( $p < 0.05$ ). As the proportion of endothelial  
277 tissue of the vascular wall is largely higher for the vein than the artery, similar levels of p-  
278 eNOS<sup>Ser1177</sup> and eNOS protein in artery and vein had to be interpreted as higher endothelial NO  
279 production by arterial than by venous endothelium. Supporting a control of endothelium BDNF  
280 synthesis by NO, endothelial BDNF expression in SED rats was higher in artery than in vein  
281 (Figure 1C). EX stimulated NO production in both artery and vein. In artery, EX increased p-  
282 eNOS<sup>Ser1177</sup> and eNOS protein by a factor 2.78 and 2.27 respectively and eNOS mRNA by a  
283 factor 2.2. The corresponding factors for the effect of EX in vein were 1.75, 2 and 1.73.  
284 Difference between artery and vein did not reach significance (down part of Table 2). These  
285 data combined with those of BDNF indicated that EX-induced changes in endothelial NO  
286 production coincided with similar variations in endothelial BDNF expression induced by EX.  
287 Of note, consistent with a non-selective localization of vascular BDNF in endothelial cells,  
288 vascular p-eNOS<sup>Ser1177</sup> or eNOS (protein) levels were not correlated with vascular BDNF levels  
289 (data not shown).

290

291 **DISCUSSION**

292 The main results provided by the present study are that i) in baseline physiological  
293 conditions, BDNF expression by VSMC is negligible as compared to endothelial BDNF  
294 expression either in abdominal aorta and vena cava, ii) EX increases BDNF expression in  
295 arterial and venous endothelial cells with a comparable magnitude, while it does not change  
296 BDNF expression in VSMC, iii) endothelial BDNF expression mirrors endothelial NO  
297 production and correlates with endothelial expression of p-TrkB<sup>Ty816</sup>.

12

## ARTERIAL AND VENOUS BDNF

298 Most of what is known on vascular BDNF originates from studies on cultured  
299 endothelial cells and VSMC from different origins. However, experiments on cultured cells  
300 cannot fully replicate the *in vivo* environment. In addition, endothelial and muscular phenotypes  
301 differ between artery and vein (5, 26). Despite this observation, studies aiming to compare  
302 endothelial and muscular BDNF productions by cells derived from arterial vs venous vessels  
303 are lacking. Our results revealed that BDNF in baseline conditions is very weakly expressed by  
304 the media of both abdominal aorta and vena cava as compared to endothelial expression and  
305 that muscular as well as endothelial BDNF expressions were higher in artery than in vein.  
306 Another major difference between endothelial and muscular BDNF is that EX exclusively  
307 changed endothelial BDNF expression (x4) irrespective of the vessel. These data emphasize a  
308 role of endothelial but not muscular BDNF in vascular physiology and support the idea that  
309 FSS is a main regulator of vascular BDNF synthesis. Indeed, FSS is higher in artery than in  
310 vein from a similar territory but EX increase FSS to a same extent in these two vessels.

311 A well-documented effect of FSS on endothelial cells is an intensity-dependent increase  
312 in endothelial NO production (34). Evidence that FSS resulted in BDNF overproduction by  
313 HUVEC cells (24, 32) and that incubation of vessels or exposure of cultured endothelial cells  
314 with a slow releasing NO donor increased and with a NOS inhibitor decreased BDNF levels  
315 (14, 15, 24, 31) strongly suggest that NO may be the intermediate between FSS and endothelial  
316 BDNF synthesis *in vivo*. Consistently, our results showed that changes in endothelial NO  
317 production translate into changes in endothelial BDNF production in the same way. Indeed,  
318 endothelial BDNF expression as NO production were higher in artery than in vein (Figure 1  
319 and Table 2). However, EX that stimulated NO production to a same extent in artery and vein  
320 increases endothelial BDNF expression by a factor 4 in both vessels (Figure 2 and Table 2).  
321 These data resonate with the demonstration that the angiogenic effect of exercise involves the  
322 activation of the BDNF/TrkB axis in an NO-dependent manner (32). Intriguingly, EX-induced

## ARTERIAL AND VENOUS BDNF

323 elevation of vascular BDNF levels in either artery or vein occurred without an associated trend  
324 in elevation of vascular BDNF mRNA levels (Figure 2). Such mismatch between protein and  
325 mRNA BDNF levels in response to EX suggests the involvement of NO in the maturation of  
326 BDNF from its precursor pro-BDNF. Of note, FSS was reported to increase activity and  
327 synthesis of pro protein convertases including furin, responsible for the processing of pro-  
328 BDNF into BDNF (11, 18).

329 As already stated in the Introduction section, exposure to exogenous BDNF of cultured  
330 endothelial cells and isolated vessels was reported to induce relaxation, angiogenesis and  
331 protect against cytotoxicity and inflammation. Cultured endothelial cells were reported to  
332 secrete BDNF according to a constitutive and regulated manner. However, whether BDNF  
333 secreted by endothelial cells acts as an autocrine factor *in vivo* remains speculative. Supporting  
334 an autocrine action of endothelial-derived BDNF, the present study showed that endothelial  
335 BDNF expression correlated with endothelial FL-TrkB activation. This is in line with a recent  
336 study in which FSS-related angiogenic response of EX was reported to be attenuated by TrkB  
337 inhibition (32). However, the possibility that circulating BDNF accounted for endothelial TrkB  
338 activation cannot be excluded even though whether BDNF is present in rat plasma *in vivo*  
339 remains an open question (31). In fact, the detection of BDNF in plasma sample might be due  
340 to lysis of platelets, which contain high BDNF levels, during preparation of blood sample (31).  
341 In accordance with an autocrine action of endothelial-derived BDNF, preliminary experiments  
342 from our laboratory revealed the existence of activated TrkB receptors in the aortic endothelium  
343 of mice whose platelets, serum and plasma blood do not contain BDNF.

344

345 As a study limitation, we are aware that both shear stress-dependent and -independent  
346 mechanisms may account for the cardiovascular benefits of exercise (19) even though shear  
347 stress is an important physiological stimulus for the control of endothelial function by exercise.

## ARTERIAL AND VENOUS BDNF

348 Therefore, the present study cannot exclude that mechanisms unrelated to NO are involved in  
349 exercise-induced endothelial overexpression. For instance, while exercise decreases circulating  
350 TNF- $\alpha$  levels (23), the exposure of peripheral endothelial cells to the cytokine results in BDNF  
351 downregulation (1). Moreover, exercise increases blood levels of adrenalin and irisin, factors  
352 already identified as positive modulators of BDNF synthesis (8, 9, 33).

353

354 In conclusion, our results reveal that BDNF is highly expressed by both arterial and  
355 venous endothelium as compared to muscular cells with higher expression in the former and  
356 that EX results in uniform response of BDNF and TrkB activation in artery and vein from a  
357 similar territory. These data suggest that endothelial BDNF should be included to the already  
358 long list of endothelium-derived factors and that this factor is controlled by EX. Further studies  
359 are required to explore the role of endothelial BDNF in exercise-induced vascular benefits.

360

361 **ACKNOWLEDGMENTS**

362 The authors are grateful to Damien Buat-Menard for assistance with immunofluorescence  
363 analysis.

364

365 **DISCLOSURES**

366 No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the authors.

367

368 **AUTHOR CONTRIBUTIONS**

369 All authors were involved in drafting the article, and all authors approved the final version to  
370 be published. APT and MC had full access to all of the data in the study and takes responsibility  
371 for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis. Study conception and design:

15

## ARTERIAL AND VENOUS BDNF

372 APT, CM. Acquisition of data: MC, AQ, APT, NP. Analysis and interpretation of data: MC,

373 APT, PG, CM.

374

## 375 REFERENCES

- 376 1. **Bayas A, Hummel V, Kallmann BA, Karch C, Toyka KV, and Rieckmann P.** Human cerebral  
377 endothelial cells are a potential source for bioactive BDNF. *Cytokine* 19: 55-58, 2002.
- 378 2. **Cao L, Zhang L, Chen S, Yuan Z, Liu S, Shen X, Zheng X, Qi X, Lee KK, Chan JY, and Cai D.** BDNF-  
379 mediated migration of cardiac microvascular endothelial cells is impaired during ageing. *Journal of*  
380 *cellular and molecular medicine* 16: 3105-3115, 2012.
- 381 3. **Corson MA, James NL, Latta SE, Nerem RM, Berk BC, and Harrison DG.** Phosphorylation of  
382 endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress. *Circ Res* 79: 984-991, 1996.
- 383 4. **Donovan MJ, Miranda RC, Kraemer R, McCaffrey TA, Tessarollo L, Mahadeo D, Sharif S,**  
384 **Kaplan DR, Tsoulfas P, Parada L, and et al.** Neurotrophin and neurotrophin receptors in vascular  
385 smooth muscle cells. Regulation of expression in response to injury. *The American journal of pathology*  
386 147: 309-324, 1995.
- 387 5. **Eriksson EE, Karlof E, Lundmark K, Rotzius P, Hedin U, and Xie X.** Powerful inflammatory  
388 properties of large vein endothelium in vivo. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 25: 723-  
389 728, 2005.
- 390 6. **Guo S, Kim WJ, Lok J, Lee SR, Besancon E, Luo BH, Stins MF, Wang X, Dedhar S, and Lo EH.**  
391 Neuroprotection via matrix-trophic coupling between cerebral endothelial cells and neurons. *Proc Natl*  
392 *Acad Sci U S A* 105: 7582-7587, 2008.
- 393 7. **Jiang H, Huang S, Li X, Li X, Huang S, Zhang Y, and Chen ZY.** Endothelial tyrosine kinase receptor  
394 B prevents VE-cadherin cleavage and protects against atherosclerotic lesion development in ApoE-/  
395 mice. *Oncotarget* 6: 30640-30649, 2015.
- 396 8. **Jodeiri Farshbaf M, Ghaedi K, Megraw TL, Curtiss J, Shirani Faradonbeh M, Vaziri P, and Nasr-**  
397 **Esfahani MH.** Does PGC1alpha/FNDC5/BDNF Elicit the Beneficial Effects of Exercise on  
398 Neurodegenerative Disorders? *Neuromolecular Med* 18: 1-15, 2016.
- 399 9. **Juric DM, Loncar D, and Carman-Krzan M.** Noradrenergic stimulation of BDNF synthesis in  
400 astrocytes: mediation via alpha1- and beta1/beta2-adrenergic receptors. *Neurochem Int* 52: 297-306,  
401 2008.
- 402 10. **Kallmann BA, Wagner S, Hummel V, Buttman M, Bayas A, Tonn JC, and Rieckmann P.**  
403 Characteristic gene expression profile of primary human cerebral endothelial cells. *FASEB J* 16: 589-  
404 591, 2002.
- 405 11. **Kang H, Duran CL, Abbey CA, Kaunas RR, and Bayless KJ.** Fluid shear stress promotes  
406 proprotein convertase-dependent activation of MT1-MMP. *Biochemical and biophysical research*  
407 *communications* 460: 596-602, 2015.
- 408 12. **Kermani P, and Hempstead B.** Brain-derived neurotrophic factor: a newly described mediator  
409 of angiogenesis. *Trends in cardiovascular medicine* 17: 140-143, 2007.
- 410 13. **Leventhal C, Rafii S, Rafii D, Shahar A, and Goldman SA.** Endothelial trophic support of  
411 neuronal production and recruitment from the adult mammalian subependyma. *Molecular and*  
412 *cellular neurosciences* 13: 450-464, 1999.
- 413 14. **Marie C, Pedard M, Quirie A, Tessier A, Garnier P, Totoston P, and Demougeot C.** Brain-derived  
414 neurotrophic factor secreted by the cerebral endothelium: A new actor of brain function? *Journal of*  
415 *cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow*  
416 *and Metabolism* 271678X18766772, 2018.
- 417 15. **Meuchel LW, Thompson MA, Cassivi SD, Pabellick CM, and Prakash YS.** Neurotrophins induce  
418 nitric oxide generation in human pulmonary artery endothelial cells. *Cardiovasc Res* 91: 668-676, 2011.

## ARTERIAL AND VENOUS BDNF

- 419 16. **Monnier A, Prigent-Tessier A, Quirie A, Bertrand N, Savary S, Gondcaille C, Garnier P,**  
 420 **Demougeot C, and Marie C.** Brain-derived neurotrophic factor of the cerebral microvasculature: a  
 421 forgotten and nitric oxide-dependent contributor of brain-derived neurotrophic factor in the brain.  
 422 *Acta Physiol (Oxf)* 219: 790-802, 2017.
- 423 17. **Nagahara AH, and Tuszynski MH.** Potential therapeutic uses of BDNF in neurological and  
 424 psychiatric disorders. *Nature reviews Drug discovery* 10: 209-219, 2011.
- 425 18. **Negishi M, Lu D, Zhang YQ, Sawada Y, Sasaki T, Kayo T, Ando J, Izumi T, Kurabayashi M,**  
 426 **Kojima I, Masuda H, and Takeuchi T.** Upregulatory expression of furin and transforming growth factor-  
 427 beta by fluid shear stress in vascular endothelial cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*  
 428 21: 785-790, 2001.
- 429 19. **Nystoriak MA, and Bhatnagar A.** Cardiovascular Effects and Benefits of Exercise. *Front*  
 430 *Cardiovasc Med* 5: 135, 2018.
- 431 20. **Otani K, Okada M, and Yamawaki H.** Expression pattern and function of tyrosine receptor  
 432 kinase B isoforms in rat mesenteric arterial smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 467:  
 433 683-689, 2015.
- 434 21. **Pedard M, Cefis M, Ennequin G, Quirie A, Garnier P, Prigent-Tessier A, Pernet N, and Marie**  
 435 **C.** Brain-derived Neurotrophic Factor Pathway after Downhill and Uphill Training in Rats. *Medicine and*  
 436 *science in sports and exercise* 2018.
- 437 22. **Pedard M, Quirie A, Totoson P, Verhoeven F, Garnier P, Tessier A, Demougeot C, and Marie**  
 438 **C.** Vascular brain-derived neurotrophic factor pathway in rats with adjuvant-induced arthritis: Effect of  
 439 anti-rheumatic drugs. *Atherosclerosis* 274: 77-85, 2018.
- 440 23. **Petersen AM, and Pedersen BK.** The anti-inflammatory effect of exercise. *J Appl Physiol (1985)*  
 441 98: 1154-1162, 2005.
- 442 24. **Prigent-Tessier A, Quirie A, Maguin-Gate K, Szostak J, Mossiat C, Nappey M, Devaux S, Marie**  
 443 **C, and Demougeot C.** Physical training and hypertension have opposite effects on endothelial brain-  
 444 derived neurotrophic factor expression. *Cardiovasc Res* 100: 374-382, 2013.
- 445 25. **Quirie A, Hervieu M, Garnier P, Demougeot C, Mossiat C, Bertrand N, Martin A, Marie C, and**  
 446 **Prigent-Tessier A.** Comparative effect of treadmill exercise on mature BDNF production in control  
 447 versus stroke rats. *PLoS One* 7: e44218, 2012.
- 448 26. **Richardson MR, Lai X, Witzmann FA, and Yoder MC.** Venous and arterial endothelial  
 449 proteomics: mining for markers and mechanisms of endothelial diversity. *Expert review of proteomics*  
 450 7: 823-831, 2010.
- 451 27. **Sandrini L, Ieraci A, Amadio P, Veglia F, Popoli M, Lee FS, Tremoli E, and Barbieri SS.** Sub-  
 452 Chronic Stress Exacerbates the Pro-Thrombotic Phenotype in BDNF(Val/Met) Mice: Gene-Environment  
 453 Interaction in the Modulation of Arterial Thrombosis. *Int J Mol Sci* 19: 2018.
- 454 28. **Sukhovshin RA, Yepuri G, and Ghebremariam YT.** Endothelium-Derived Nitric Oxide as an  
 455 Antiatherogenic Mechanism: Implications for Therapy. *Methodist DeBakey cardiovascular journal* 11:  
 456 166-171, 2015.
- 457 29. **Takeda K, Kermani P, Anastasia A, Obinata Y, Hempstead BL, and Kurihara H.** BDNF protects  
 458 human vascular endothelial cells from TNFalpha-induced apoptosis. *Biochem Cell Biol* 91: 341-349,  
 459 2013.
- 460 30. **Takeda K, Obinata Y, Konishi A, Kajiya M, Matsuda S, Mizuno N, Sasaki S, Fujita T, and**  
 461 **Kurihara H.** Brain-Derived Neurotrophic Factor Inhibits Intercellular Adhesion Molecule-1 Expression  
 462 in Interleukin-1beta-Treated Endothelial Cells. *Cell Biochem Biophys* 74: 399-406, 2016.
- 463 31. **Totoson P, Pedard M, Marie C, and Demougeot C.** Activation of endothelial TrkB receptors  
 464 induces relaxation of resistance arteries. *Vascular pharmacology* 2018.
- 465 32. **Wang BL, Jin H, Han XQ, Xia Y, and Liu NF.** Involvement of brain-derived neurotrophic factor  
 466 in exercise-induced cardioprotection of post-myocardial infarction rats. *International journal of*  
 467 *molecular medicine* 42: 2867-2880, 2018.
- 468 33. **Wrann CD, White JP, Salogiannis J, Laznik-Bogoslavski D, Wu J, Ma D, Lin JD, Greenberg ME,**  
 469 **and Spiegelman BM.** Exercise induces hippocampal BDNF through a PGC-1alpha/FNDC5 pathway. *Cell*  
 470 *Metab* 18: 649-659, 2013.

ARTERIAL AND VENOUS BDNF

471 34. **Xu S, Li X, LaPenna KB, Yokota SD, Huke S, and He P.** New insights into shear stress-induced  
472 endothelial signalling and barrier function: cell-free fluid versus blood flow. *Cardiovascular research*  
473 113: 508-518, 2017.

474

475

**Table 1. Primer sequences for real-time RT-PCR analysis**

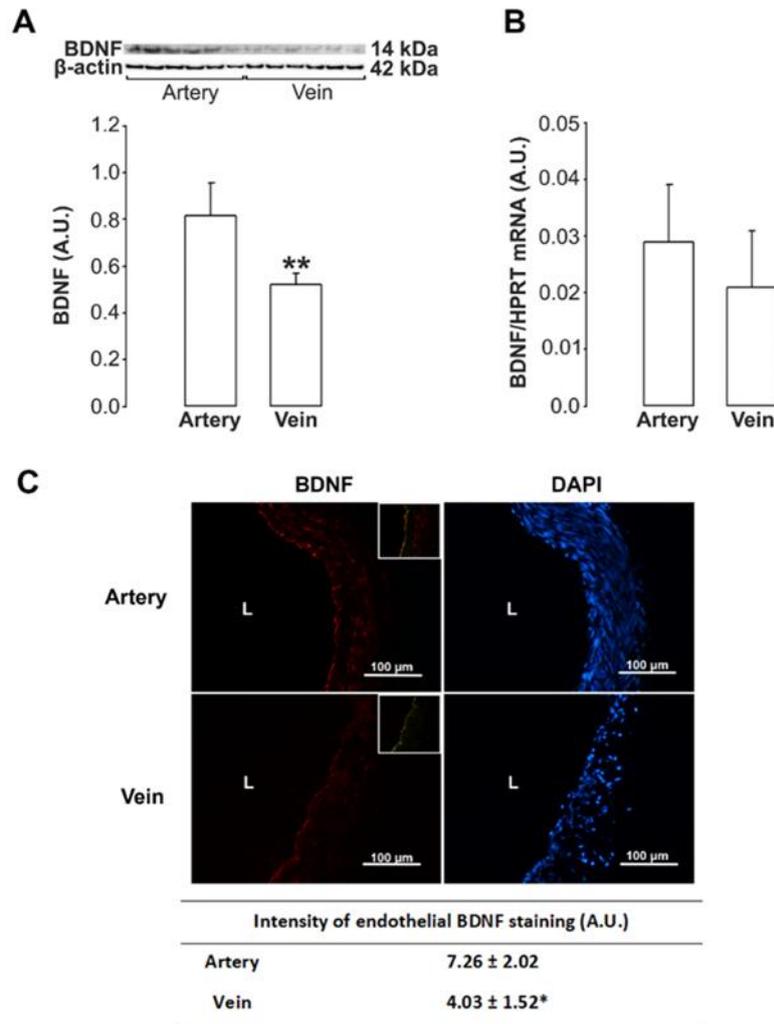
| Gene         | Primer sequence  | T <sub>m</sub><br>(°C) | Product size (bp) |
|--------------|--|------------------------|-------------------|
| <i>bdnf</i>  | FWD: 5' – ATGGTTATTTCACTTTCGGTTGCA – 3'<br>RVS: 5' – AGCTGGGTAGGCCAAGTTG – 3'  | 59.35<br>59.62         | 87                |
| <i>enos</i>  | FDW: 5' - CACGAGGACATTTTCGGACT – 3'<br>RVS: 5' - ACCTAATGAAGCGACGCAGT – 3'     | 57.92<br>59.75         | 201               |
| <i>hpert</i> | FWD: 5' - GCGAAAGTGGAAAAGCCAAGT -3'<br>RVS : 5' – GCCACATCAACAGGACTCTTGAG – 3' | 59.93<br>61.39         | 76                |

Abbreviations: *bdnf*: brain-derived neurotrophic factor; *enos*: endothelial nitric oxide synthase; *hpert*: hypoxanthine phosphoribosyl transferase; FWD: forward; RVS: reverse; T<sub>m</sub>: melting temperature.

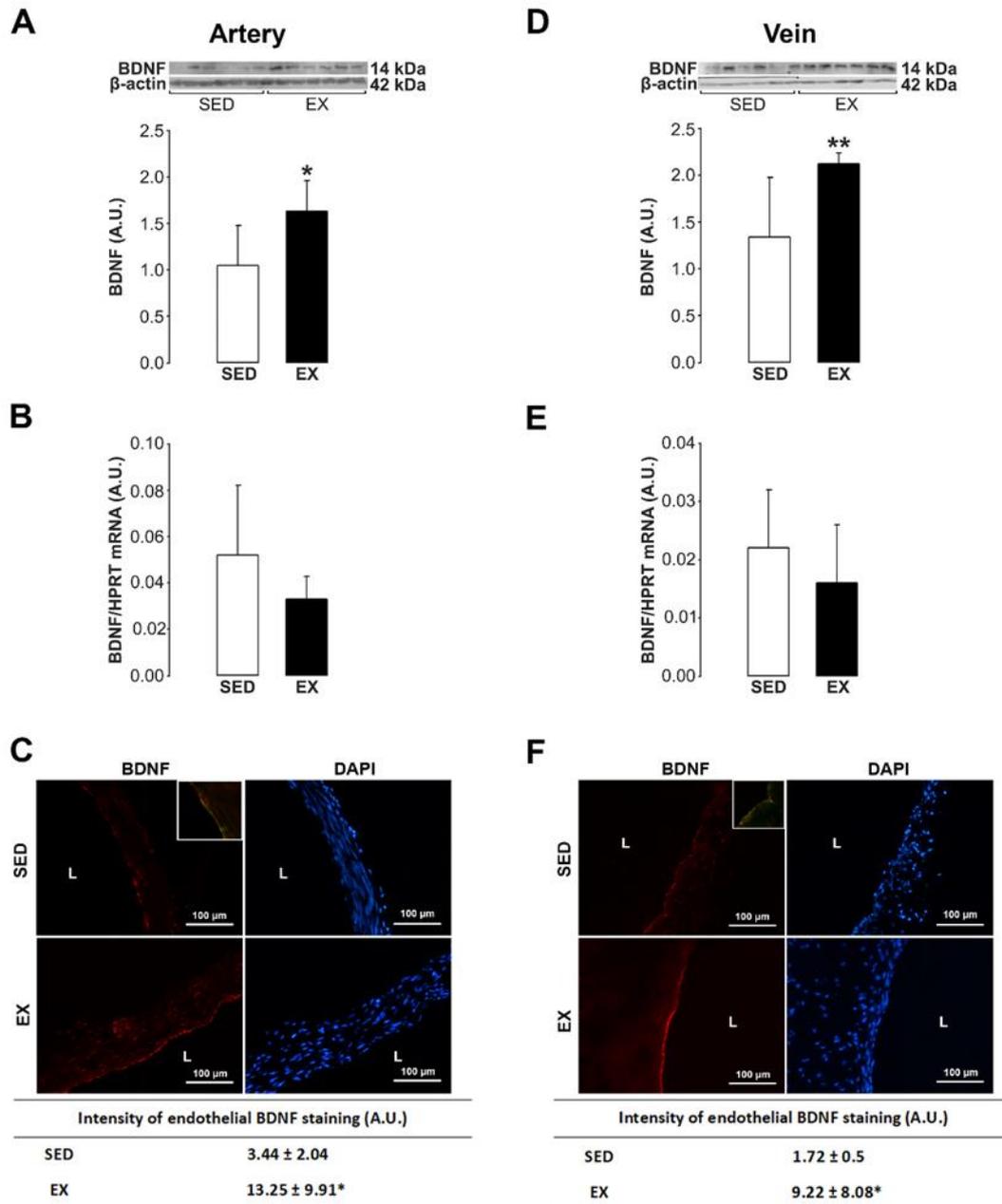
**Table 2. Comparative endothelial NO production in artery vs vein**

| Expressions in SED rats (arbitrary units) |                                   |                      |                    |
|---|-----------------------------------|----------------------|--------------------|
|   | p-eNOS <sup>Ser1177</sup> protein | eNOS protein         | eNOS mRNA          |
| Artery                                    | 1.09 ± 0.29                       | 0.89 ± 0.32          | 0.10 ± 0.03        |
| Vein                                      | 1.07 ± 0.32                       | 0.85 ± 0.16          | 0.17 ± 0.06        |
|   | NS                                |                      | p < 0.05           |
| Effect of EX (% of SED values)            |                                   |                      |                    |
|   | p-eNOS <sup>Ser1177</sup> protein | eNOS protein         | eNOS mRNA          |
| Artery                                    | + 278.6 % ± 52.9*                 | + 227 % ± 93.7*      | + 220 % ± 67.8**   |
| Vein                                      | + 175% ± 75*                      | + 202.09 % ± 77.76** | + 173.7 % ± 47.5** |
|   | NS                                |                      | NS                 |

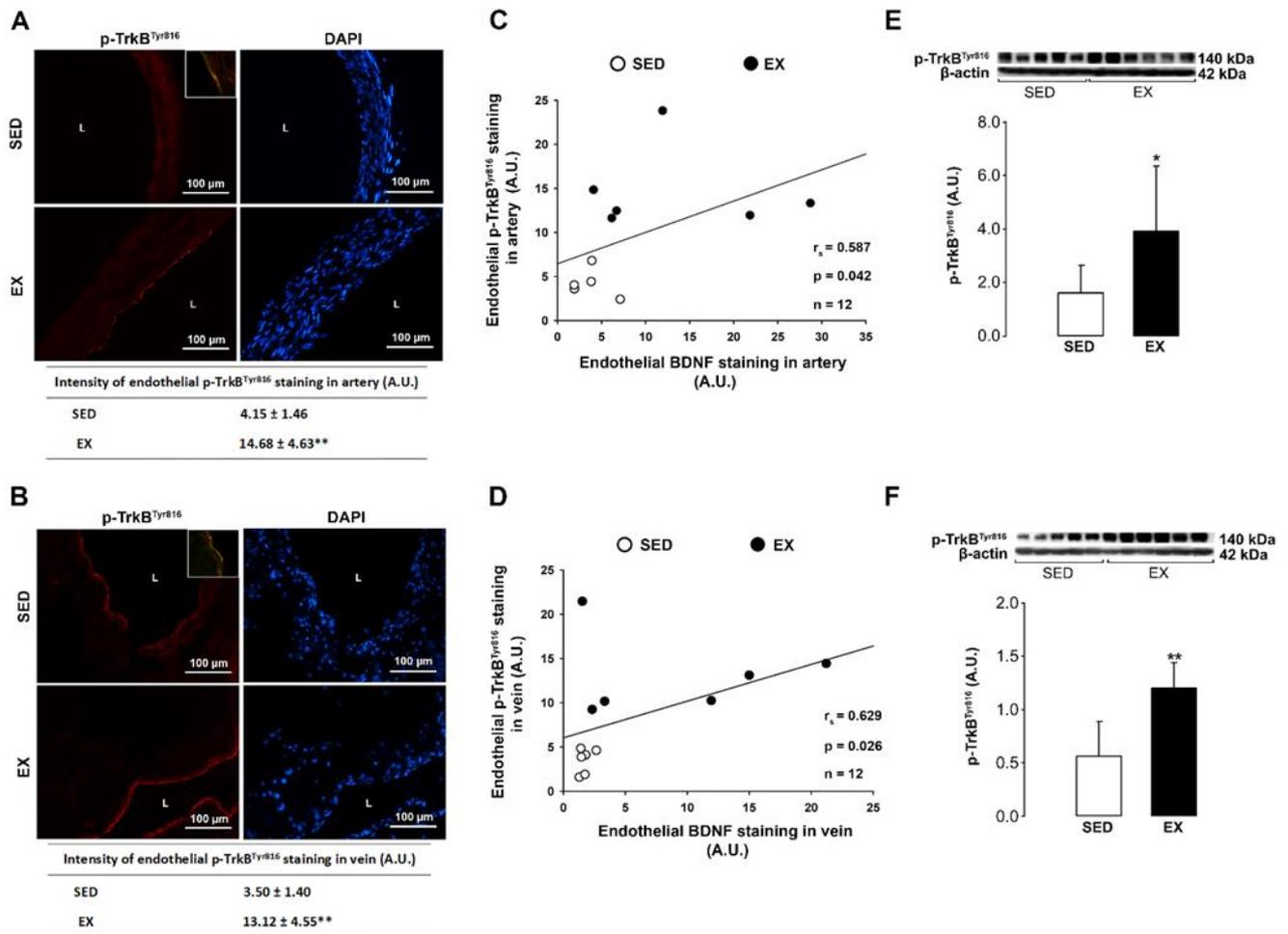
Levels of eNOS phosphorylated at serine 1177 (p-eNOS<sup>Ser1177</sup> protein) and eNOS (protein, mRNA) were measured in rats either sedentary (SED, n = 6) and subjected to exercise (EX, n = 6) in artery (abdominal aorta) and vein (vena cava). Values (arbitrary units) are expressed as means ± SD. No significant difference was observed between artery and vein except for eNOS mRNA levels in baseline condition. \* p < 0.05, \*\* p < 0.01 different from SED values, n = number of rats.



**Figure 1. Arterial vs venous BDNF levels and localization in baseline conditions.** Levels of BDNF protein (A), mRNA (B) as well as BDNF localization (C) were determined in abdominal aorta and vena cava of sedentary rats. Immunoblots of BDNF (14 kDa) and β-actin (42 kDa) are shown above bar charts. In representative photographs of BDNF staining (red), DAPI (blue) and von Willebrand factor (green) were used as nuclear and endothelial markers, respectively. Overlay (insert with vWF/BDNF) show BDNF staining in endothelial cells in artery and vein. L = vascular lumen. Values (arbitrary units) are expressed as means ± SD from 6 rats. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  different from artery.

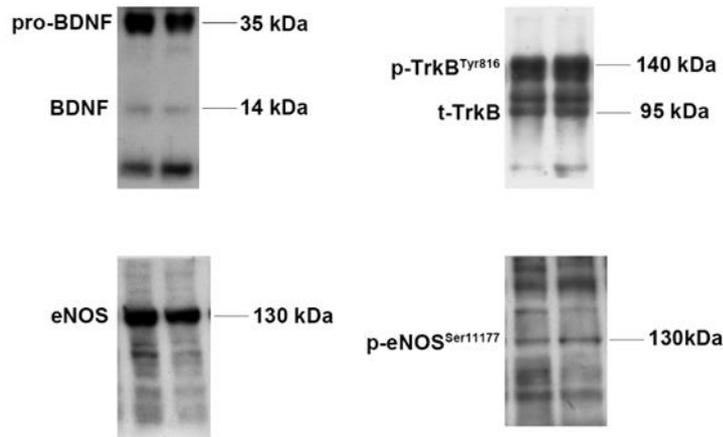


**Figure 2. Effect of physical exercise on arterial and venous BDNF production.** Levels of BDNF protein, mRNA as well as BDNF localization were investigated in abdominal aorta (A, B, C) and vena cava (D, E, F) of sedentary (SED) and exercised (EX) rats. Immunoblots of BDNF (14 kDa) and β-actin (42 kDa) are shown above bar charts. In representative photographs of BDNF staining (red), DAPI (blue) and von Willebrand factor (green) were used as nuclear and endothelial markers, respectively. Overlay (insert with vWF/BDNF) shows BDNF staining in endothelial cells. L = vascular lumen. Values (arbitrary units) are expressed as means ± SD from 6 rats/group. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  different from SED rats.

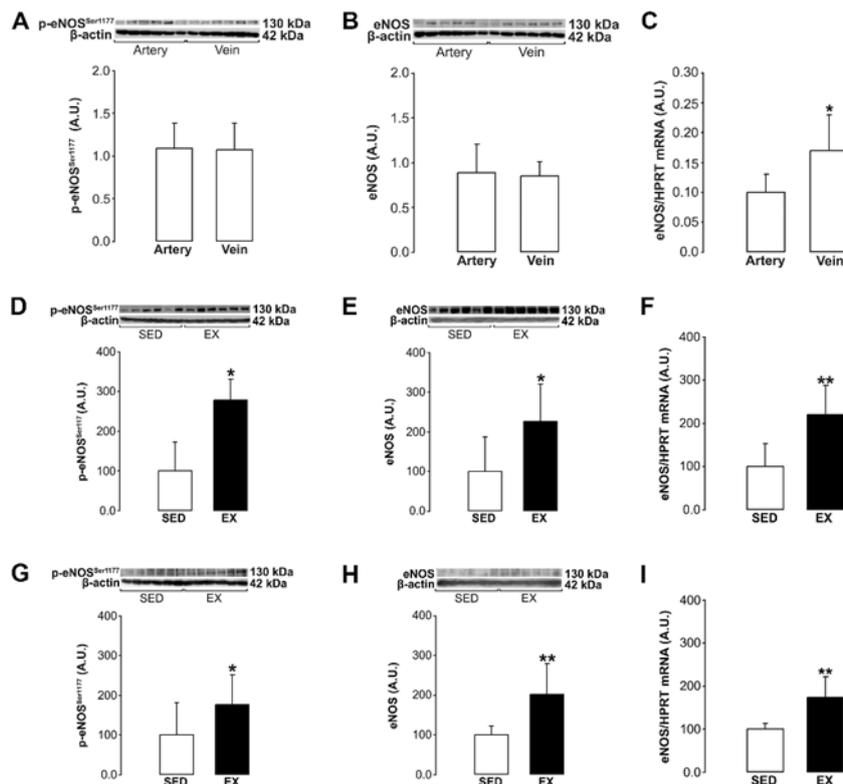


**Figure 3. Effect of exercise on endothelial TrkB receptor activation.** Localization of TrkB phosphorylated at tyrosine 816 (p-TrkB<sup>Tyr816</sup>), an indicator of TrkB activation by endogenous BDNF, was investigated in abdominal aorta (A) and vena cava (B) removed from sedentary (SED) and exercised (EX) rats. In representative photographs of p-TrkB<sup>Tyr816</sup> (red), DAPI (blue) and von Willebrand factor (green) were used as nuclear and endothelial markers, respectively. Overlay (insert with vWf/ p-TrkB<sup>Tyr816</sup>) shows p-TrkB<sup>Tyr816</sup> staining in endothelial cells. L = vascular lumen, n = 6 rats/group. Scatter plot between individual endothelial p-TrkB<sup>Tyr816</sup> and BDNF staining in artery (C) and vein (D). Levels of p-TrkB<sup>Tyr816</sup> protein was investigated in abdominal aorta (E) and vena cava (F) from SED (n = 5) and EX (n = 6) rats. Immunoblots of p-TrkB<sup>Tyr816</sup> (140 kDa) and β-actin (42 kDa) are shown above bar charts. Values (arbitrary units) are expressed as means ± SD.  $r_s$  = spearman correlation coefficient. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  different from SED rats, n = number of rats.

## SUPPLEMENTAL DATA



**Figure 1.** Non-crop immunoblots of BDNF (14 kDa), p-TrkB<sup>Tyr816</sup> (140 kDa), eNOS (130 kDa) and p-eNOS<sup>Ser1177</sup> (130 kDa) proteins obtained by western blotting. Molecular weight is expressed in kilodalton (kDa). Note the presence of pro-BDNF and BDNF as well as the presence of both Full-Length (p-TrkB<sup>Tyr816</sup>) and truncated (t-TrkB) form of TrkB receptors.



**Figure 2.** Levels of eNOS phosphorylated at serine 1177 (p-eNOS<sup>Ser1177</sup> protein) and eNOS (protein, mRNA) were determined in abdominal aorta and vena cava from rats either sedentary (SED) or exercised (EX). Levels were compared either between artery and vein in SED rats (A, B, C) or between SED and EX rats for artery (D, E, F) and vein (G, H, I). Immunoblots of p-eNOS<sup>Ser1177</sup>, eNOS (130 kDa) and β-actin (42 kDa) are shown above bar charts. Values are expressed as means ± SD in arbitrary unit (A.U.) for A to C data and in % of SED values for D to I data, from 6 rats/group. \* p < 0.05, \*\* p < 0.01 different from artery or SED rats.

II. Etude 2 : Deuxième publication – L'effet de l'exercice sur la mémoire et la voie de signalisation du BDNF dépend de l'intensité

**Titre:**

The effect of exercise on memory and BDNF signaling is dependent on intensity

**Auteurs :**

Marina Cefis, Anne Prigent-Tessier, Aurore Quirié, Nicolas Pernet, Christine Marie, Philippe  
Garnier

**Journal:**

Article publié dans Brain Structure and Function (2019)

DOI: 10.1007/s00429-019-01889-7

PMID: 31089854

## Résumé des travaux

### a. Contexte

Il est maintenant admis que les effets bénéfiques de l'EX sur l'apprentissage et la mémoire sont à relier à une augmentation des taux cérébraux de BDNF, une neurotrophine impliquée dans la neuroplasticité. Cependant, peu d'études se sont intéressées à l'effet de l'intensité de l'EX sur la mémoire en lien avec l'augmentation de l'expression de BDNF. De plus, le lien de proportionnalité entre les bénéfices cognitifs et l'activation de la voie BDNF/TrkB n'est pas clairement établi.

### b. Objectifs

Dans ce contexte, les objectifs de cette étude étaient d'une part, de 1) déterminer si l'activation de la voie BDNF/TrkB au niveau cérébral dépendait de l'intensité de l'EX, et d'autre part, de 2) caractériser si l'amélioration de la mémoire induite par l'EX était proportionnelle à l'activation de la voie BDNF/TrkB.

### c. Protocole expérimental

Les expériences ont été conduites chez des rats mâles WISTAR adultes SED ou soumis à un EX sur tapis roulant (position horizontale), 30 min/j pendant 7 jours consécutifs. L'intensité de l'EX a été modulée par la vitesse du tapis : 12 m/min pour le groupe EX12 et 18 m/min pour le groupe EX18. Dans ces conditions, l'intensité de l'EX est voisine de 40% de la VMA pour le groupe EX12 et de 70-75% pour le groupe EX18. Les taux protéiques de BDNF, p-TrkB<sup>Tyr816</sup>, SYN, p-eNOS<sup>Ser1177</sup> (index du flux sanguin cérébral) et c-fos (index de l'activité neuronale) ont été déterminés par WB dans les régions impliquées dans les processus cognitifs : l'hippocampe et le cortex préfrontal.

Par ailleurs, la mémoire des animaux a été évaluée par le test de reconnaissance d'objet, après des injections de scopolamine, un antagoniste des récepteurs muscariniques connus pour induire une amnésie transitoire chez l'animal.

### d. Principaux résultats

Les résultats obtenus mettent en évidence que l'activation de la voie BDNF/TrkB dans l'hippocampe et le cortex préfrontal dépend de l'intensité de l'EX. A l'étage fonctionnel, l'EX

seul ne permet pas d'améliorer la mémoire des animaux. En revanche, la pratique d'un EX à intensité soutenue rétablit la mémoire des animaux, préalablement altérée par des injections de scopolamine. D'après nos résultats, le cortex préfrontal représente une structure de choix pour l'étude de l'amélioration potentielle de la mémoire lorsque des marqueurs neuroplastiques tels que le BDNF sont utilisés comme reflet de cette amélioration.

### **Conclusion de l'étude**

Cette étude révèle que l'expression cérébrale de BDNF induite par l'EX dépend de l'intensité de l'EX. Ces effets sont à relier à une amélioration de la mémoire des animaux, en cas de troubles cognitifs. Ainsi, dans nos conditions expérimentales, le cortex préfrontal semble être la structure cérébrale de choix lorsque les marqueurs neuroplastiques sont utilisés comme reflet des améliorations de la mémoire. Sur le plan clinique, cette étude fournit une preuve de l'utilité de prescrire de l'EX à une intensité soutenue par exemple à des adolescents souffrant de troubles de la mémoire associés à la prise de drogues. Dans le cadre de la prescription de l'EX, le paramètre intensité devrait être pris en compte.



# The effect of exercise on memory and BDNF signaling is dependent on intensity

Marina Cefis<sup>1</sup> · Anne Prigent-Tessier<sup>1</sup> · Aurore Quirié<sup>1</sup> · Nicolas Pernet<sup>1</sup> · Christine Marie<sup>1</sup> · Philippe Garnier<sup>1,2</sup>

Received: 12 December 2018 / Accepted: 4 May 2019  
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

## Abstract

The aims of the present study were to investigate in brain of adult rats (1) whether exercise-induced activation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF)/tropomyosin-related kinase B (TrkB) pathway is dependent on exercise intensity modality and (2) whether exercise-induced improvement of memory is proportional to this pathway activation. Wistar rats were subjected to low (12 m/min) or high (18 m/min) exercise intensity on horizontal treadmill (30 min/day, 7 consecutive days) that corresponds to ~40 and 70% of maximal aerobic speed, respectively. Animals treated with scopolamine to induce memory impairment were subjected to novel object recognition test to assess potential improvement in cognitive function. Expressions of BDNF, phosphorylated TrkB receptors, synaptophysin (a marker of synaptogenesis), c-fos (a neuronal activity marker) and phosphorylated endothelial nitric oxide synthase (a cerebral blood flow marker) were measured in prefrontal cortex and hippocampus of different groups of rats. In terms of cognition, our data reported that only the most intense exercise improves memory performance. Our data also revealed that BDNF pathway is dependent on intensity modality of exercise with a gradual effect in hippocampus whereas only the highest intensity leads to this pathway activation in prefrontal cortex. Our study revealed that memory improvement through BDNF pathway activation is dependent on exercise intensity. While reporting that our protocol is sufficient to improve cognition in animals with impaired memory, our data suggest that prefrontal cortex is possibly a more suitable structure than hippocampus when neuroplastic markers are used to mirror potential improvement in memory performance.

**Keywords** Brain-derived neurotrophic factor · Exercise intensity · Hippocampus · Prefrontal cortex

## Introduction

The regular practice of physical exercise (EX) is the most potent non-pharmacological strategy to positively enhance brain health. Indeed, numerous studies have reported positive actions of EX in both animals and humans. From animal studies, EX has been reported to promote memory and learning performance in rodents and to reverse impairment in memory and spatial learning in old or stressed animals (Aguilar et al. 2008; Loprinzi and Frith 2018; Yau et al. 2011). In humans, analysis showed that active individuals

may have decreased risk of cognitive impairment and neurodegenerative disorders (Sofi et al. 2011). Moreover, being physically active during the early life has been associated with protection against cognitive decline later in life (Hotting and Roder 2013). Physical EX benefits also to younger adults since it has been shown that exercise improved psychological well-being, cognitive performance (Hogan et al. 2013) and was related to a decreased risk of substance use disorders in adolescent (Nock et al. 2017). The positive effects of EX are linked to the ability of the neural system to modify its organization notably through an increase in synapse number and efficacy (Farmer et al. 2004; van Praag et al. 1999).

Among the molecules responsible for the structural and functional brain changes, brain-derived neurotrophic factor (BDNF) appeared to be an appealing candidate. BDNF acts through its high-affinity for tropomyosin-related kinase B (TrkB) receptor eliciting intracellular signaling cascades that

✉ Philippe Garnier  
pgarnier@u-bourgogne.fr

<sup>1</sup> INSERM UMR1093-CAPS, Université Bourgogne Franche-Comté, UFR des Sciences de Santé, 7 boulevard Jeanne d'Arc, 21000 Dijon, France

<sup>2</sup> Département Génie Biologique, IUT, 21000 Dijon, France

mainly impact positively brain function (Reichardt 2006). In response to EX, brain BDNF is produced in neurons but also in cerebral endothelial cells through mechanisms involving increase in neuronal activity and shear stress-dependent expression (Marie et al. 2018; Monnier et al. 2017a, b; Vaynman et al. 2003). In favor of the strong involvement of BDNF in the positive effect of EX on brain health, convincing evidences are given by studies showing that anti-BDNF strategies using antibody against its cognate TrkB receptor negate exercise-associated cognitive benefits (Gomez-Pinilla et al. 2008; Liu et al. 2008). In addition, in human, the val66met polymorphism which is associated with an alteration of BDNF activity-dependent release moderates the cognitive benefits of EX (Erickson et al. 2013; Hopkins et al. 2012).

The typology of the better regimen of EX is not known. In rodents, beneficial effects on brain health have been reported after different type of EX such as treadmill/wheel running or swimming exercise (Liu et al. 2009; Ogonovszky et al. 2005; Vaynman et al. 2004). Of note, brain BDNF elevation in physically trained animals has been described to be dependent of the duration (Sheikhzadeh et al. 2015) while its link with the frequency of training sessions remains controversial (Costa et al. 2012; Dalise et al. 2017). In terms of intensity modality, evidences showed that this parameter is positively associated with a lower risk of cardiovascular diseases (Kemi et al. 2002, 2005), but surprisingly, the connection between EX intensity and brain function improvement is poorly investigated (Pedard et al. 2018). Furthermore, whether cognitive benefits proportionate to changes in the BDNF/TrkB pathway is not known.

Thus, the aims of the present study were to investigate in adult rats (1) whether EX-induced activation of the brain BDNF/TrkB/synaptophysin pathway is dependent on intensity modality and (2) whether EX-induced improvement of memory function is proportional to the levels of activation of this pathway. For this purpose, animals were subjected to horizontal treadmill EX at low (12 m/min, EX12) or high intensity (18 m/min, EX18), 30 min a day for 7 consecutive days. Rats treated with scopolamine to induce memory impairment were assessed for memory performance through the novel object recognition (NOR) test while the expressions of BDNF, phosphorylated TrkB receptors at tyrosine 816 (p-TrkB<sup>Y816</sup>), synaptophysin (SYN, a marker of synaptogenesis), c-fos (a marker of neuronal activity) and phosphorylated endothelial nitric oxide synthase at serine 1177 (p-eNOS<sup>S1177</sup>, a marker of cerebral blood flow) were measured in prefrontal cortex (PFC) and hippocampus (HP) of rats either sedentary (SED) or exercised at both intensities.

## Materials and methods

### Animals

Experiments were carried out on 10-week-old Wistar rats ( $n = 69$ ) according to the French Department of Agriculture guidelines (License 21-CAE-099) and approved by the local ethic committee. They conformed to the European convention for protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. The animals were housed five per cage, kept under a 12-h/12-h light/dark cycle and allowed ad libitum access to food and water. Rats were purchased from Janvier (Le Genest Saint Isle, France).

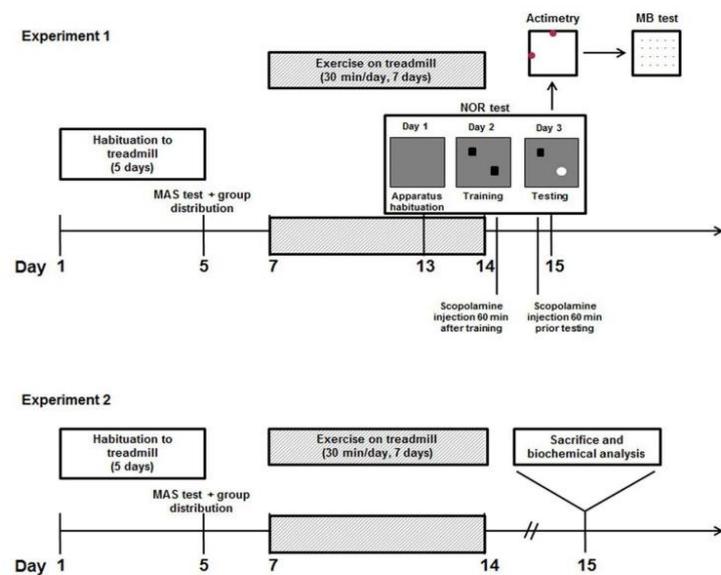
### Exercise training (EX) protocol and groups of rats

After a habituation period to the experimenter and treadmill apparatus (5 days), all animals were first subjected to an incremental to exhaustion exercise test on a treadmill (from 9 m/min to exhaustion by step of 3 m/min for 2 min) to determine their maximal aerobic speed (MAS, m/min). Refractory animals (three rats) to the treadmill exercise during the habituation period were excluded from the experiment. According to their MAS values, animals were allocated to three different groups: SED (sedentary,  $n = 34$ ), low-intensity EX (speed of the treadmill set at 12 m/min, EX12,  $n = 16$ ), high-intensity EX (speed of the treadmill training set at 18 m/min, EX18,  $n = 16$ ). Using these conditions, EX intensity was ~40 and 70% of MAS for EX12 and EX18 groups, respectively. In the SED group, animals with different MAS were allocated. Rats assigned to the different EX groups were trained 30 min/day (morning) using a horizontal treadmill for 7 consecutive days while SED rats were kept in their own cage at the proximity of the treadmill apparatus. Of note, no impact of EX was observed in terms of weight between the three groups of rats (data not shown). Animals were separated in two experiments to (1) assess the memory, the anxiety and locomotor activity (Experiment 1,  $n = 40$ ) and (2) measure the biochemical changes of BDNF, p-TrkB<sup>Y816</sup>, SYN, c-fos, p-eNOS<sup>S1177</sup> after EX (Experiment 2,  $n = 18$ ). The experimental design is summarized in Fig. 1.

### Novel object recognition (NOR) test

Animals from SED ( $n = 20$ ), EX12 ( $n = 10$ ) and EX18 ( $n = 10$ ) groups of Experiment 1 were submitted to the novel object recognition (NOR) test. The test was performed the morning during three consecutive days starting the last day of EX in a dark plastic enclosure (size: 60 × 60 cm with 40 cm side walls) located in a dimly lit room with constant illumination (45 Lux). NOR test (Fig. 1, Experiment

**Fig. 1** Schematic experimental design of Experiment 1 and 2. *MAS* maximal aerobic speed, *NOR* novel object recognition test, *MB* marble burying test



1) consisted in a habituation phase (Day 1) during which animals explored for 10 min the empty arena. After 24 h, animals were placed in the center of the previous area with two identical objects to explore during 5 min (Day 2). These objects were placed equidistantly to the opposite corners of the enclosure (27.5 cm between each object, 20 cm between object and corner). Then, animals were immediately replaced in home cages. Twenty-four hours later (Day 3), animals were again positioned in the center of the field in the presence of the same object previously observed, and with a novel object during 2 min.

Position of each object was exchanged between animals to avoid potential confounding spatial clues. The enclosure and objects were cleaned with 70% ethanol before each session and between each animal to minimize odor cues. Time spent exploring each object was recorded. A rat was considered exploring an object when its head was facing the object (<2 cm) or when it was touching/sniffing the object. The NOR test analyses were performed by two persons blinded from experimental conditions.

Scopolamine, a non-selective post-synaptic muscarinic receptor blocker that impairs cognitive function via diminishing the effectiveness of acetylcholine in the central nervous system in animals and humans (Ebert and Kirch 1998; Klinkenberg and Blokland 2010) was used to induce memory impairment in animals of Experiment 1. Rats were assigned into four groups: SED + saline solution, SED + scopolamine, EX12 + scopolamine, and EX18 + scopolamine. Treatment of scopolamine hydrobromide (1 mg/kg, i.p., 161750010, Acros organics) or saline solution was administered 60 min after training phase (Day 2) and 60 min

prior the testing phase (Day 3) of NOR test. The protocol of administration used in our study was designed to disturb both memory consolidation during the training phase as well as the capacity to discriminate the novel object during the testing phase (Ennaceur and Meliani 1992; Martini et al. 2018).

### Collection of brain samples

Twenty-four hours after the last treadmill session, rats of Experiment 2 ( $n=26$ ) were anesthetized with chloral hydrate (400 mg/kg, i.p., Sigma-Aldrich) and transcardially perfused with saline during 5 min to flush out blood from brain vasculature. After decapitation, brains were removed and two brain regions involved in cognition, hippocampus (HP) and prefrontal cortex (PFC) pooled from both hemispheres were quickly dissected on ice glass slide, immediately weighted and frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  until further use.

### Western blotting

Western blotting procedure was performed as previously described (Pedard et al. 2018). HP and PFC were homogenized in 10 volumes of ice cold lysis buffer [100 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4), 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EGTA, 1% triton X-100, 1% protease inhibitor cocktail (P8340, Sigma-Aldrich), 1% phosphatase inhibitor cocktail (78420, Fischer Scientific)]. After homogenization, the protein concentration was measured using the Lowry method. Equal amounts of protein were separated on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and

electrophoretically transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes using Turbo Transblot technology (1704150, Biorad). After blocking non-specific binding sites overnight at 4 °C, with a 5% solution of non-fat dry milk or 7.5% BSA in Tris Buffered Saline (20 mM Tris/HCl, 137 mM NaCl, pH 7.4) containing 0.1% Tween 20 (TBST), membranes were probed with an anti-BDNF (1/3000, rabbit monoclonal antibody, ab108319, Abcam), anti-p-TrkB<sup>Y816</sup> (1/1000, rabbit monoclonal antibody, ABN 1381, Merck Millipore), anti-c-fos (1/1000, mouse monoclonal antibody, sc-166940, Santa Cruz Biotechnology) anti-SYN (1/3000, rabbit polyclonal antibody, RB-1461-P1, Interchim), anti-p-eNOS<sup>S1177</sup> (1/1000, mouse monoclonal antibody, 612383, BD Biosciences) and anti- $\beta$ -actin antibodies (1/10,000, mouse monoclonal antibody, A5441, Sigma-Aldrich). Then, membranes were incubated at room temperature with horseradish peroxidase [111-035-144 (anti-rabbit) and 115-035-166 (anti-mouse), 1:10,000 to 1:50,000 according to the protein, Jackson ImmunoResearch Laboratories]. Protein-antibody complexes were visualized using the enhanced chemiluminescence western blotting detection system (ECL 2, 1151-7371, Fisher Scientific). The band densities were determined by scanning densitometry (GS-800, Biorad Laboratories). Two groups of six rats were analyzed on the same gel, and each gel was run in triplicate. Data were analyzed and a representative immunoblot is shown above each graph.

Importantly, the amount of protein required to detect the protein of interest results in a signal that far exceeds the linear dynamic range when detecting  $\beta$ -actin, thereby eliminating the usefulness of  $\beta$ -actin for the normalization of western blots,  $\beta$ -actin being used here as an internal standard only to verify that proteins were indeed loaded on the gel. The appropriate amounts of total proteins to be analyzed were determined from concentration (increasing amounts of proteins)/response (optical density of the band) curves from two rats both belonging to a particular group (on the same gel). All gels were run in triplicate and identical amount of protein for each sample were loaded in the gel. Data were expressed as arbitrary units and were calculated from a representative gel.

### Data and statistical analysis

SigmaPlot 11.0 was used for statistical analysis and GraphPad Prism 6 for all graphs. Data were expressed as means  $\pm$  standard deviations (SD) for protein expression. Differences between two groups were assessed using parametric *t* test or non-parametric Mann–Whitney test, depending on the normality and equal variance tests.

Pearson's and Spearman's correlations were used to measure the strength of the relationship between paired data, depending on normality distribution. In correlation

description, *r* represents Pearson correlation coefficient and *r<sub>s</sub>*, Spearman correlation coefficient.

For the NOR test, difference between time spent exploring F and N objects were assessed by a Wilcoxon matched paired signed rank test.

A value of *p* < 0.05 was considered statistically significant.

## Results

### Exercise intensity effect on memory

#### Novel object recognition (NOR) test

No statistical difference was obtained concerning the total exploration time at training and testing steps between each group of rats (data not shown). For the testing phase (Day 3), two different objects were presented and the time spent to explore each was recorded. Our data showed that in physiological conditions, the times spent exploring the N and F objects were not statistically different in SED and EX animals indicating that EX did not improve memory in healthy animals (data not shown). However, when treated with scopolamine (Fig. 2), the EX18 group of rats exhibited a significant increase in terms of exploration duration of the N compared to the F object ( $6.22 \pm 3.76$  vs.  $3.99 \pm 1.58$ , *p* < 0.01).

Of note, no difference was observed in terms of locomotor activity (actimetry) and anxiogenic response (marble burying test) in the different treated groups of animals (data not shown).

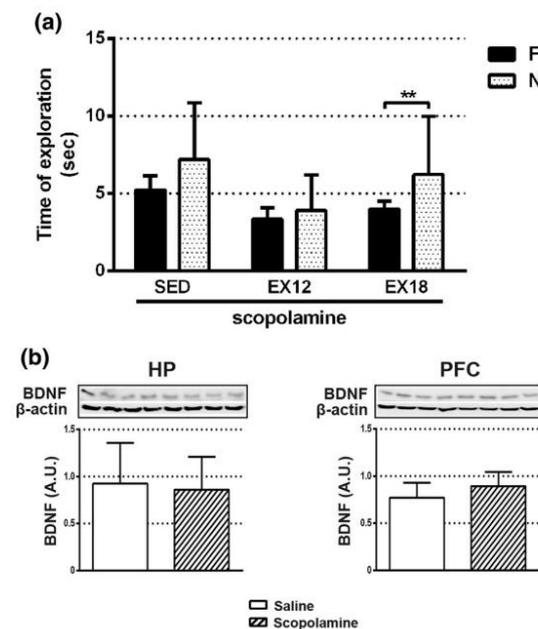
### Effect of scopolamine treatment on BDNF expression

Since scopolamine has been shown to exert contradictory effect on BDNF expression (Ghosal et al. 2018; Lee et al. 2014), BDNF expression was assessed in the HP and the PFC of SED rats receiving two i.p. injections of scopolamine (1 mg/kg, daily). As shown in Fig. 2b, no variation in BDNF expression could be observed either in the PFC or in the HP.

### Exercise intensity effect on BDNF signaling

#### Hippocampus (HP)

BDNF, p-TrkB<sup>Y816</sup> and SYN levels were assessed in the HP of SED animals and compared to EX12 or EX18 groups. The results of the effect of EX on BDNF signaling in the HP are presented in Fig. 3.



**Fig. 2** Effect of exercise on scopolamine-induced memory impairment in the novel object recognition (NOR) test. **a** The times spent to explore the novel (N, dotted) and familiar (F, white) objects during day 3 of novel object recognition test, were compared for each groups: sedentary (SED), exercised at 12 m/min (EX12), exercised at 18 m/min (EX18) treated with scopolamine hydrobromide 1 mg/kg (10 rats/group). **b** BDNF expression in the hippocampus (HP) and prefrontal cortex (PFC) of SED rats treated or not with scopolamine hydrobromide 1 mg/kg. (4 rats/group). A.U. arbitrary units.  $**p < 0.01$  compared to exploration time of F object

### BDNF, p-TrkB<sup>Y816</sup>, SYN

As shown in Fig. 3, both intensities of EX led to a significant increase in BDNF (Fig. 3a, b), p-TrkB<sup>Y816</sup> (Fig. 3d, e) and SYN (Fig. 3g, h) expressions. These variations were dependent on EX intensity for BDNF and SYN since for both proteins, EX12 induced an increase in protein levels significantly lower than EX18 (Fig. 3c, i). Concerning p-TrkB<sup>Y816</sup> expression, no significant intensity effect was observed when p-TrkB<sup>Y816</sup> expression was compared by plotting EX12 and EX18 groups on the same membrane (Fig. 3f).

### c-fos

To verify whether increase in neuronal activity was proportionated to the intensity of EX, c-fos expression was assessed in EX12 and EX18 groups and compared to SED animals. As shown in Fig. 4, both intensities of EX led to a sustained c-fos expression compared to SED values. Indeed, EX12 exhibited an increase of 97% (Fig. 4a) whereas EX18

rats showed an elevation of c-fos expression of 133.5% (Fig. 4b). When compared on the same membrane, no significant difference was obtained between the two modalities of EX (Fig. 4c).

### p-eNOS<sup>S1177</sup>

When p-eNOS<sup>S1177</sup> was assessed as a marker of shear stress elevation in hippocampal structure (Fig. 4), our results revealed that although both intensities enhanced endothelial NO production, only EX18 reached significance with a 216.3% increase compared to SED group (Fig. 4e). Consistently, when both intensities were analyzed on the same membrane, p-eNOS<sup>S1177</sup> expression in EX18 group exhibited a strong rise compared to EX12 group (Fig. 4f).

### Prefrontal cortex (PFC)

BDNF, p-TrkB<sup>Y816</sup> and SYN levels were assessed in the PFC of SED group and compared to trained EX12 and EX18 animals (Fig. 5).

### BDNF, p-TrkB<sup>Y816</sup>, SYN

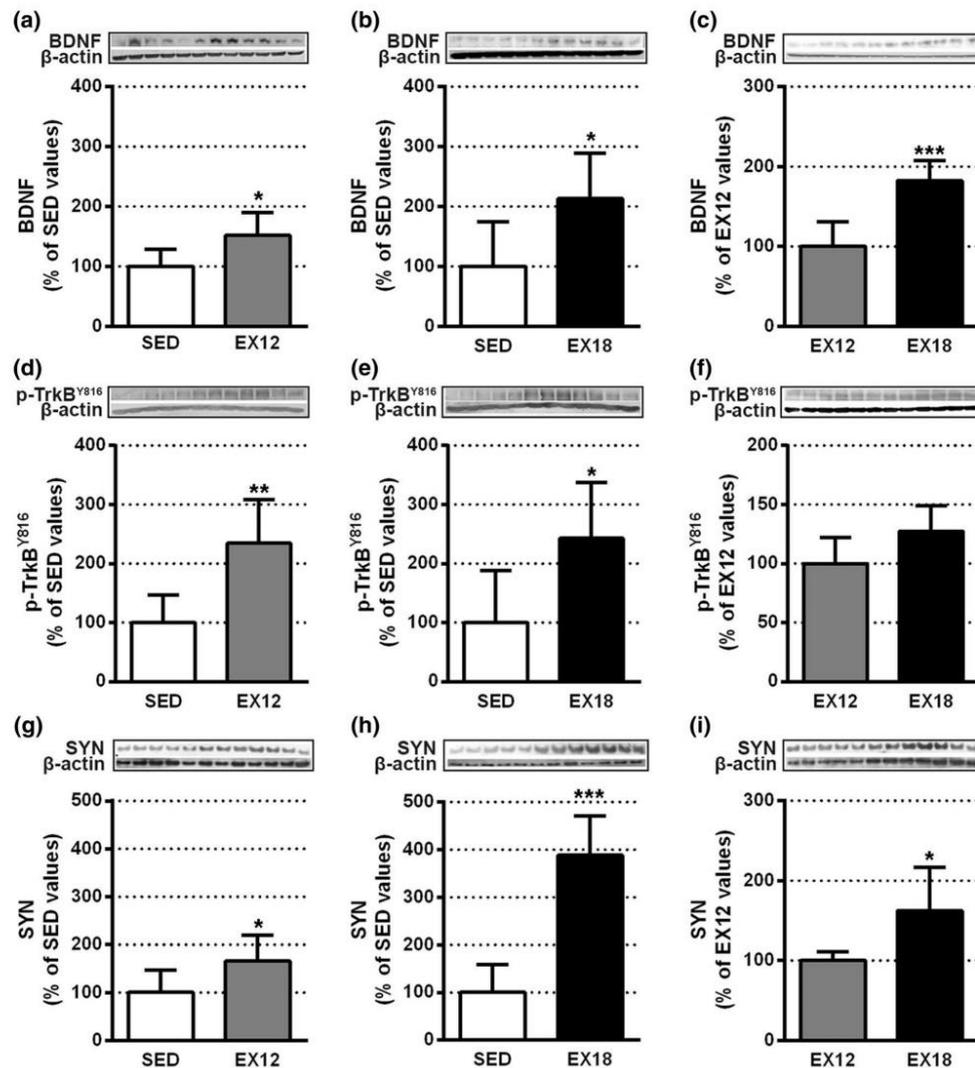
As shown in Fig. 5, among the different groups of trained animals, only EX18 rats exhibited a significant increase in BDNF (Fig. 5a, b), p-TrkB<sup>Y816</sup> (Fig. 5d, e) and SYN (Fig. 5g, h) expressions as compared to SED animals. When both groups of EX were compared on the same membrane, significant increase in BDNF and p-TrkB<sup>Y816</sup> expressions were revealed for EX18 compared to EX12 rats (Fig. 5c, f). Concerning SYN expression, EX18 showed no significant augmentation compared to EX12 group (Fig. 5i).

### c-fos

As shown in Fig. 6, both groups of trained animals exhibited a significant increase in c-fos expression (+71%, EX12 and +117.1%, EX18) compared to SED values. When EX12 and EX18 were compared on the same membrane, a significant difference of 91% (Fig. 6c) was observed.

### p-eNOS<sup>S1177</sup>

As assessed in Fig. 6, both intensities led to an increase in p-eNOS<sup>S1177</sup> expression. As compared to SED values, EX12 induced an increase of 79.3% whereas EX18 showed a rise of 227.1% in p-eNOS<sup>S1177</sup> expression (Fig. 6d, e). When both intensities were compared on the same membrane, p-eNOS<sup>S1177</sup> expression was significantly higher in EX18 (+126.2%) compared to EX12 animals (Fig. 6f).



**Fig. 3** Effect of exercise on BDNF/p-TrkB<sup>Y816</sup>/synaptophysin pathway in hippocampus. BDNF (a–c), p-TrkB<sup>Y816</sup> (d–f) and synaptophysin (SYN, g–i) levels in the hippocampus of trained rats at 12 (EX12) and 18 m/min (EX18) compared to sedentary rats (SED). Corre-

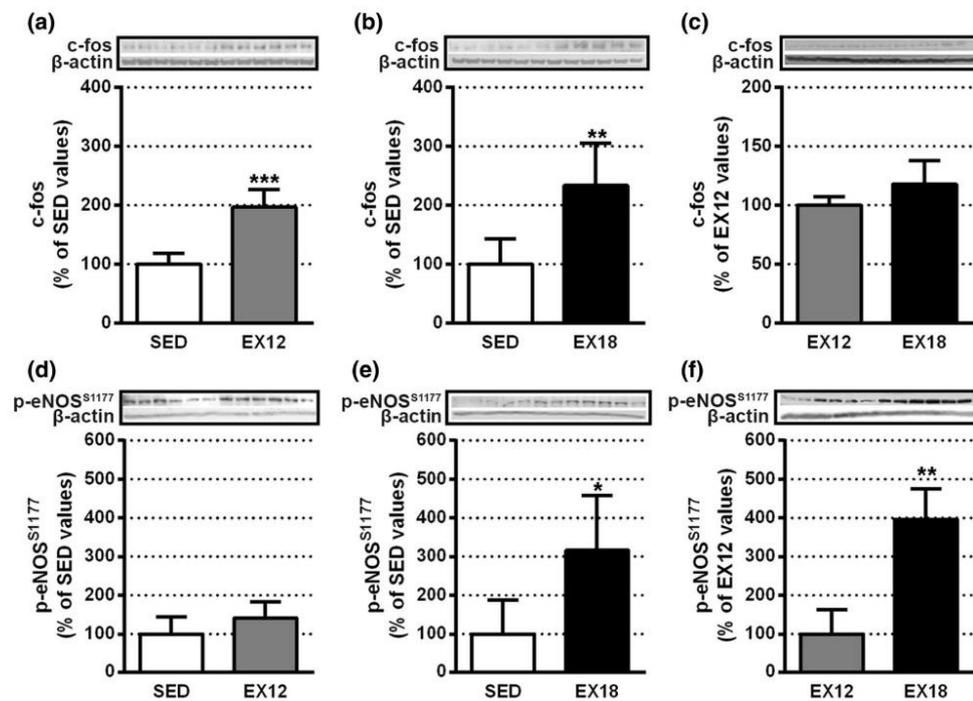
sponding immunoblots of the proteins of interest and  $\beta$ -actin as the internal control are shown above the bar charts. Values are expressed as mean  $\pm$  SD (6 rats/group). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  compared to SED or EX12 values

#### Association between BDNF and SYN expressions in both cerebral structures

To assess whether BDNF expression in the HP and PFC could be linked to neuroplastic changes, association between BDNF and SYN expressions were performed using correlation test (data not shown). Regarding the HP,

positive associations were found when values of SED animals were plotted against EX12 ( $r = 0.752$ ,  $p = 0.004$ ) and EX18 ( $r_s = 0.792$ ,  $p = 0.001$ ) groups of animals.

In the PFC, BDNF was positively associated to SYN expression when SED animals were plotted against EX18 ( $r = 0.859$ ,  $p = 0.0003$ ) but not against EX12 ( $r = 0.569$ ,  $p = 0.053$ ) groups of animals.



**Fig. 4** Impact of exercise intensity on c-fos and p-eNOS<sup>S1177</sup> expressions in hippocampus. Assessment of c-fos (a–c), and p-eNOS<sup>S1177</sup> (d–f) levels in the hippocampus of sedentary (SED) and trained rats exercised at 12 (EX12) and 18 m/min (EX18). Corresponding immu-

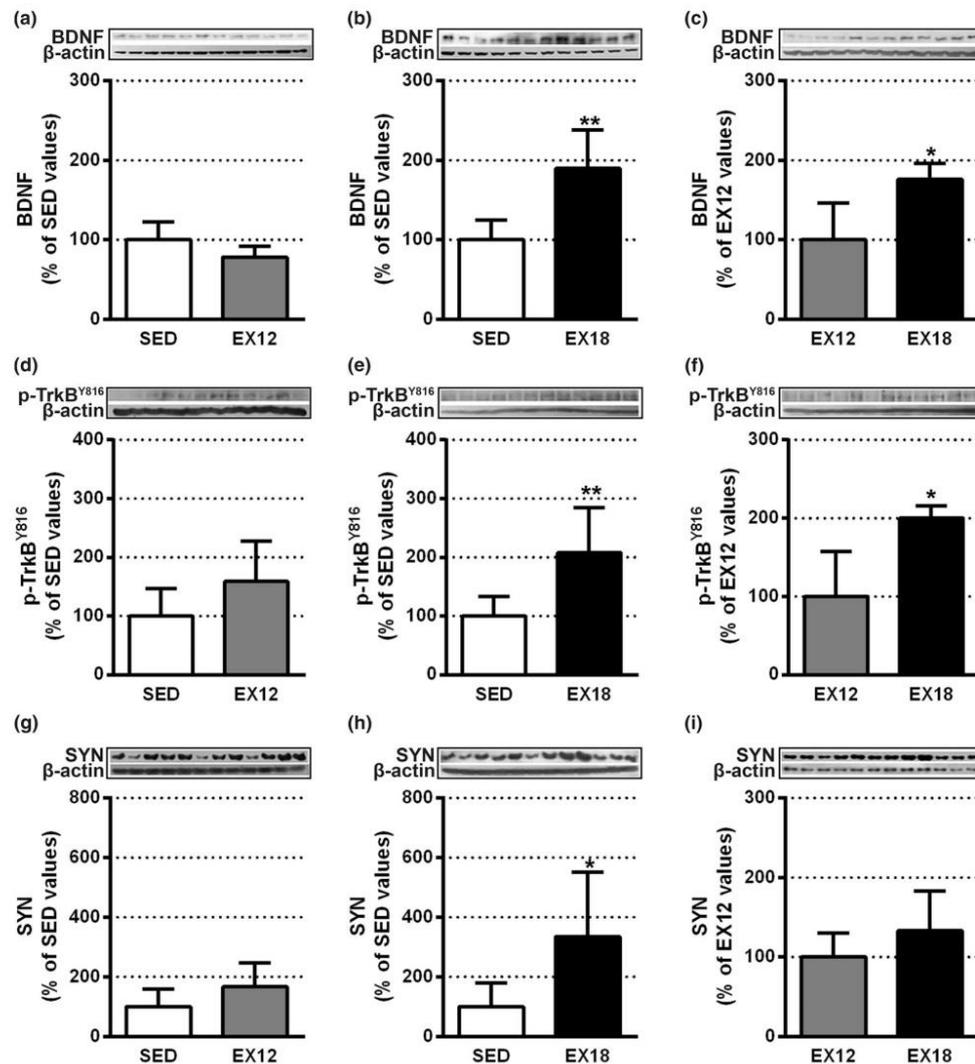
noblots of proteins of interest and  $\beta$ -actin as the internal control are shown above the bar charts. Values are expressed as mean  $\pm$  SD (6 rats/group). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  compared to SED or EX12 values

## Discussion

The present study revealed that only the most intense EX (horizontal treadmill at 18 m/min, 30 min a day, 7 consecutive days) improves memory performance assessed by NOR test and showed in both cerebral structures analyzed, that BDNF/TrkB/SYN pathway is dependent on intensity modality of EX with a gradual effect in the HP whereas in the PFC, only the highest intensity (EX18) led to a significant activation of this pathway.

Our data extend previous results showing the induction of the BDNF/TrkB pathway by EX (Monnier et al. 2017a; Pedard et al. 2018; Prigent-Tessier et al. 2013; Quirie et al. 2012). In our experimental setting, our results provide strong evidences showing that this elevation was dependent on EX intensity since in both cerebral structures, BDNF and p-TrkB<sup>Y816</sup> expressions were always higher in EX18 compared to EX12 group of animals. However, concerning animals exercised at low intensity, biochemical assessments gave different results according to the cerebral structure analyzed. Indeed, while in the HP, EX at 12 m/min was sufficient to significantly increase the expression of these

markers, no statistical effect could be observed in the PFC. This difference of sensitivity to EX between these two brain areas could be explained by structural/histological difference but also by discrepancy in terms of neuronal activation and/or elevation of cerebral blood flow. Indeed, when analyzing neuronal activation through c-fos expression, our data showed in HP that the EX12 regimen already triggered a sustained increase statistically comparable to EX18 whereas in PFC, an intensity-dependent neuronal activation was reported. Concerning cerebral blood flow increase that has been shown to elevate brain BDNF expression through a NO-dependent mechanism (Banoujaafar et al. 2014, 2016), our p-eNOS<sup>S1177</sup> expression results are coherent with studies on cerebral hemodynamic changes occurring during EX showing that EX induced hyperemia in cortical (Kimura et al. 1994) but also in sub-cortical regions such as the HP (Nakajima et al. 2003; Nishijima and Soya 2006). Consistently, the two cerebral structures analyzed in our study exhibited a similar intensity-dependent activation of eNOS. Consequently, the differences in terms of BDNF/p-TrkB<sup>Y816</sup> expressions observed at the low intensity might only relate to a disparity in neuronal activation between the two structures.

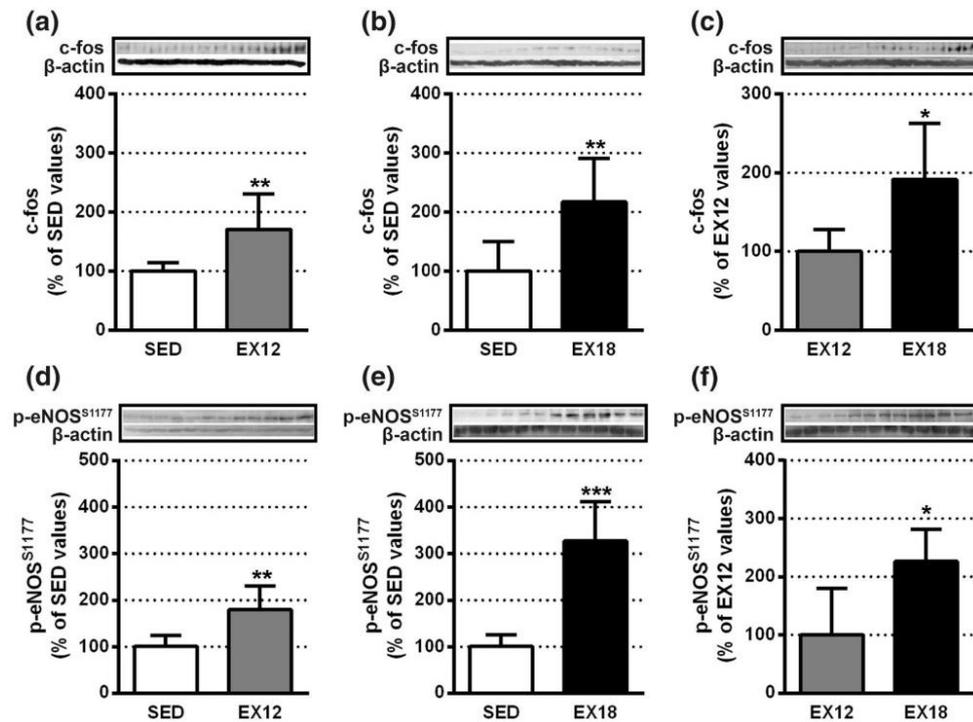


**Fig. 5** Effect of exercise intensity on BDNF/p-TrkB<sup>Y816</sup>/SYN pathway in prefrontal cortex. BDNF (a–c), p-TrkB<sup>Y816</sup> (d–f) and synaptophysin (g–i) levels in the prefrontal cortex of trained rats at 12 (EX12) and 18 m/min (EX18) compared to sedentary rats (SED). Corre-

sponding immunoblots of the proteins of interest and  $\beta$ -actin as the internal control are shown above the bar charts. Values are expressed as mean  $\pm$  SD (6 rats/group). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  compared to SED or EX12 values

Although not investigated directly in this work, BDNF/TrkB activation may be coupled to SYN induction as a reflect of synaptogenesis (Banoujaafar et al. 2014) and increase in synaptic activation since it has been reported that blocking BDNF action abrogates exercise-induced SYN expression (Vaynman et al. 2006) and that BDNF knockout mice have a reduced level of SYN in hippocampal synaptosomes (Pozzo-Miller et al. 1999). Consistently, a pattern of SYN expression similar to those of BDNF/TrkB was

observed in the two brain areas. The EX regimen performed at the maximal intensity always induced the strongest elevation of SYN expression in both prefrontal and hippocampal regions. A graduated and significant increase was obtained in the HP whereas no statistical effect could be found in the PFC at the low intensity. In addition, when exercised animals were plotted against SED animals, a positive association between BDNF and SYN expressions was found for both intensities in the HP but only at the maximal intensity



**Fig. 6** Impact of exercise intensity on c-fos and p-eNOS<sup>S1177</sup> expressions in prefrontal cortex. Assessment of c-fos (a–c), and p-eNOS<sup>S1177</sup> (d–f) levels in the prefrontal cortex of sedentary (SED) and trained rats exercised at 12 (EX12) and 18 m/min (EX18). Corre-

sponding immunoblots of proteins of interest and  $\beta$ -actin as the internal control are shown above the bar charts. Values are expressed as mean  $\pm$  SD (6 rats/group). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  compared to SED or EX12 values

in the cortical region. This discrepancy in terms of intensity-dependent-neuroplastic response in these two different brain structures is in line with the previously observed disparity in terms of BDNF/TrkB pathway related possibly to a differential neuronal activation in these two cerebral regions at the low intensity of EX.

Finally, to characterize whether neuroplastic biochemical changes had a direct impact on cognitive function, rats from SED and exercised groups were subjected to NOR test. Of note, since EX by itself was not able to improve cognition in healthy animals (data not shown), animals dedicated to behavioral tests were treated with scopolamine to induce memory impairments. In terms of memory performance, our data showed that only the EX18 group of animals exhibited cognitive improvement as assessed by a significant preference for the exploration of the novel object. Given the prominent role of HP in memory, the absence of effect on cognitive function at the low intensity (EX12) despite an increase in BDNF/TrkB/SYN pathway questions the pertinence of the study of these neuroplastic biochemical markers as a reflect of potential cognitive improvement in this cerebral area.

Consistently, this cerebral region has been shown to be not always critical for one-trial object recognition (Dere et al. 2007). In contrast, since the PFC has been reported to be anatomically related to the HP and to operate in parallel in memory consolidation (Preston and Eichenbaum 2013) and according to its important role especially in recent memory tests (Euston et al. 2012), our data showing an induction of the BDNF/TrkB/SYN pathway only at EX18 suggest that neuroplastic biochemical changes in this cerebral region would be a better mirror of potential cognitive improvement that those observed in the HP. In line with this proposal are the data showing that the PFC is needed in recent acquired memories stabilization but could play an even greater role in memory retrieval (Euston et al. 2012). Consistently, when performing object recognition task in rats, chemical disruption of the PFC in its ventromedial part through the infusion of protein synthesis inhibitor or *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist is associated to both consolidation and memory retrieval impairments (Akirav et al. 2006). Besides, it also resonates with a study suggesting in humans that the PFC initiates the processing of target-related

information to facilitate object detection during decision-making procedure (Karimi-Rouzbahani et al. 2019).

As a limitation of the study design, biochemical analyses were not performed on animals treated with scopolamine and submitted to NOR test assessments. Data from the literature show contradictory results concerning scopolamine effect on BDNF expression with an increase 1 h after a single low dose (25 µg/kg) in mice PFC (Ghosal et al. 2018) and a decrease after 14 days of treatment (2 mg/kg, daily) in rats HP (Lee et al. 2014). To verify whether our scopolamine protocol had an impact on BDNF metabolism, BDNF expression was assessed in rats receiving two injections of scopolamine (1 mg/kg, daily). In our experimental conditions, no variation in BDNF expression could be observed either in the PFC or in the HP (Fig. 2b). This absence of effect is in line with data showing oppositely that muscarinic receptor agonist does not change BDNF expression (Di Liberto et al. 2017).

In conclusion, our study revealed that BDNF/TrkB/SYN pathway activation is dependent on intensity modality of EX since the EX18 groups of animals showed the greatest expression of these neuroplastic markers associated with memory improvement as assessed by NOR test. In our experimental paradigm, our data also suggest that the PFC is possibly a more pertinent cerebral structure than the HP when neuroplastic markers are used to mirror improvement in memory performance. As a clinical standpoint, when providing a rationale for the utilization of “assisted” EX to cope for instance in young individuals with memory impairment associated to substance use, intensity modality of EX should be considered as a crucial parameter.

**Acknowledgements** The authors are grateful to Mrs. Jennifer Jones for assistance with behavioral test realization and data analysis, and finally Dr. Claire Cachia for help with statistical analysis of behavioral data.

### Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

**Ethical approval** All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed.

### References

- Aguiar AS Jr, Speck AE, Prediger RD, Kapczinski F, Pinho RA (2008) Downhill training upregulates mice hippocampal and striatal brain-derived neurotrophic factor levels. *J Neural Transm* 115:1251–1255. <https://doi.org/10.1007/s00702-008-0071-2>
- Akirav I, Khatsrinov V, Vouimba RM, Merhav M, Ferreira G, Rosenblum K, Maroun M (2006) Extinction of conditioned taste aversion depends on functional protein synthesis but not on NMDA receptor activation in the ventromedial prefrontal cortex. *Learn Mem* 13:254–258. <https://doi.org/10.1101/lm.191706>
- Banoujaafar H, Van Hoecke J, Mossiat CM, Marie C (2014) Brain BDNF levels elevation induced by physical training is reduced after unilateral common carotid artery occlusion in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 34:1681–1687. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2014.133>
- Banoujaafar H, Monnier A, Pernet N, Quirie A, Garnier P, Prigent-Tessier A, Marie C (2016) Brain BDNF levels are dependent on cerebrovascular endothelium-derived nitric oxide. *Eur J Neurosci* 44:2226–2235. <https://doi.org/10.1111/ejn.13301>
- Costa MS et al (2012) The impact of the frequency of moderate exercise on memory and brain-derived neurotrophic factor signaling in young adult and middle-aged rats. *Neuroscience* 222:100–109. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.06.068>
- Dalise S et al (2017) Biological effects of dosing aerobic exercise and neuromuscular electrical stimulation in rats. *Sci Rep* 7:10830. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11260-7>
- Dere E, Huston JP, De Souza Silva MA (2007) The pharmacology, neuroanatomy and neurogenetics of one-trial object recognition in rodents. *Neurosci Biobehav Rev* 31:673–704. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2007.01.005>
- Di Liberto V et al (2017) Anxiolytic effects of muscarinic acetylcholine receptors agonist oxotremorine in chronically stressed rats and related changes in BDNF and FGF2 levels in the hippocampus and prefrontal cortex. *Psychopharmacology* 234:559–573. <https://doi.org/10.1007/s00213-016-4498-0>
- Ebert U, Kirch W (1998) Scopolamine model of dementia: electroencephalogram findings and cognitive performance. *Eur J Clin Invest* 28:944–949
- Ennaceur A, Meliani K (1992) Effects of physostigmine and scopolamine on rats' performances in object-recognition and radial-maze tests. *Psychopharmacology* 109:321–330
- Erickson KI et al (2013) The brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism moderates an effect of physical activity on working memory performance. *Psychol Sci* 24:1770–1779. <https://doi.org/10.1177/0956797613480367>
- Euston DR, Gruber AJ, McNaughton BL (2012) The role of medial prefrontal cortex in memory and decision making. *Neuron* 76:1057–1070. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.12.002>
- Farmer J, Zhao X, van Praag H, Wodtke K, Gage FH, Christie BR (2004) Effects of voluntary exercise on synaptic plasticity and gene expression in the dentate gyrus of adult male Sprague-Dawley rats in vivo. *Neuroscience* 124:71–79. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2003.09.029>
- Ghosal S, Bang E, Yue W, Hare BD, Lepack AE, Girgenti MJ, Duman RS (2018) Activity-dependent brain-derived neurotrophic factor release is required for the rapid antidepressant actions of scopolamine. *Biol Psychiatry* 83:29–37. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2017.06.017>
- Gomez-Pinilla F, Vaynman S, Ying Z (2008) Brain-derived neurotrophic factor functions as a metabotrophin to mediate the effects of exercise on cognition. *Eur J Neurosci* 28:2278–2287. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06524.x>
- Hogan CL, Mata J, Carstensen LL (2013) Exercise holds immediate benefits for affect and cognition in younger and older adults. *Psychol Aging* 28:587–594. <https://doi.org/10.1037/a0032634>
- Hopkins ME, Davis FC, Vantighem MR, Whalen PJ, Bucci DJ (2012) Differential effects of acute and regular physical exercise on cognition and affect. *Neuroscience* 215:59–68. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.04.056>
- Hotting K, Roder B (2013) Beneficial effects of physical exercise on neuroplasticity and cognition. *Neurosci Biobehav Rev* 37:2243–2257. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2013.04.005>
- Karimi-Rouzbahani H, Vahab E, Ebrahimpour R, Menhaj MB (2019) Spatiotemporal analysis of category and target-related information processing in the brain during object detection. *Behav Brain Res* 362:224–239. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.01.025>

- Kemi OJ, Loennechen JP, Wisloff U, Ellingsen O (2002) Intensity-controlled treadmill running in mice: cardiac and skeletal muscle hypertrophy. *J Appl Physiol* 93:1301–1309. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00231.2002>
- Kemi OJ, Haram PM, Loennechen JP, Osnes JB, Skomedal T, Wisloff U, Ellingsen O (2005) Moderate vs. high exercise intensity: differential effects on aerobic fitness, cardiomyocyte contractility, and endothelial function. *Cardiovasc Res* 67:161–172. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2005.03.010>
- Kimura A, Okada K, Sato A, Suzuki H (1994) Regional cerebral blood flow in the frontal, parietal and occipital cortices increases independently of systemic arterial pressure during slow walking in conscious rats. *Neurosci Res* 20:309–315
- Klinkenberg I, Blokland A (2010) The validity of scopolamine as a pharmacological model for cognitive impairment: a review of animal behavioral studies. *Neurosci Biobehav Rev* 34:1307–1350. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2010.04.001>
- Lee B, Sur B, Shim J, Hahm DH, Lee H (2014) Acupuncture stimulation improves scopolamine-induced cognitive impairment via activation of cholinergic system and regulation of BDNF and CREB expressions in rats. *BMC Complement Altern Med* 14:338. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-338>
- Liu YF et al (2008) Upregulation of hippocampal TrkB and synaptotagmin is involved in treadmill exercise-enhanced aversive memory in mice. *Neurobiol Learn Mem* 90:81–89. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2008.02.005>
- Liu YF et al (2009) Differential effects of treadmill running and wheel running on spatial or aversive learning and memory: roles of amygdalar brain-derived neurotrophic factor and synaptotagmin I. *J Physiol* 587:3221–3231. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.173088>
- Loprinzi PD, Frith E (2018) Protective and therapeutic effects of exercise on stress-induced memory impairment. *J Physiol Sci*. <https://doi.org/10.1007/s12576-018-0638-0>
- Marie C, Pedard M, Quirie A, Tessier A, Garnier P, Totoson P, Demougeot C (2018) Brain-derived neurotrophic factor secreted by the cerebral endothelium: a new actor of brain function? *J Cereb Blood Flow Metab*. <https://doi.org/10.1177/0271678x18766772>
- Martini F, Pesarico AP, Bruning CA, Zeni G, Nogueira CW (2018) Ebselen inhibits the activity of acetylcholinesterase globular isoform G4 in vitro and attenuates scopolamine-induced amnesia in mice. *J Cell Biochem* 119:5598–5608. <https://doi.org/10.1002/jcb.26731>
- Monnier A, Garnier P, Quirie A, Pernet N, Demougeot C, Marie C, Prigent-Tessier A (2017a) Effect of short-term exercise training on brain-derived neurotrophic factor signaling in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 35:279–290. <https://doi.org/10.1097/HJH.0000000000001164>
- Monnier A et al (2017b) Brain-derived neurotrophic factor of the cerebral microvasculature: a forgotten and nitric oxide-dependent contributor of brain-derived neurotrophic factor in the brain. *Acta Physiol (Oxf)* 219:790–802. <https://doi.org/10.1111/apha.12743>
- Nakajima K, Uchida S, Suzuki A, Hotta H, Aikawa Y (2003) The effect of walking on regional blood flow and acetylcholine in the hippocampus in conscious rats. *Auton Neurosci* 103:83–92
- Nishijima T, Soya H (2006) Evidence of functional hyperemia in the rat hippocampus during mild treadmill running. *Neurosci Res* 54:186–191. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2005.11.005>
- Nock NL, Minnes S, Alberts JL (2017) Neurobiology of substance use in adolescents and potential therapeutic effects of exercise for prevention and treatment of substance use disorders. *Birth Defects Res* 109:1711–1729. <https://doi.org/10.1002/bdr2.1182>
- Ogonovszky H, Berkes I, Kumagai S, Kaneko T, Tahara S, Goto S, Radak Z (2005) The effects of moderate-, strenuous- and overtraining on oxidative stress markers, DNA repair, and memory, in rat brain. *Neurochem Int* 46:635–640. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2005.02.009>
- Pedard M et al (2018) Brain-derived neurotrophic factor pathway after downhill and uphill training in rats. *Med Sci Sports Exerc*. <https://doi.org/10.1249/mss.0000000000001771>
- Pozzo-Miller LD et al (1999) Impairments in high-frequency transmission, synaptic vesicle docking, and synaptic protein distribution in the hippocampus of BDNF knockout mice. *J Neurosci* 19:4972–4983
- Preston AR, Eichenbaum H (2013) Interplay of hippocampus and prefrontal cortex in memory. *Curr Biol* 23:R764–R773. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.05.041>
- Prigent-Tessier A et al (2013) Physical training and hypertension have opposite effects on endothelial brain-derived neurotrophic factor expression. *Cardiovasc Res* 100:374–382. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvt219>
- Quirie A et al (2012) Comparative effect of treadmill exercise on mature BDNF production in control versus stroke rats. *PLoS One* 7:e44218. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044218>
- Reichardt LF (2006) Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond Ser B Biol Sci* 361:1545–1564. <https://doi.org/10.1098/rstb.2006.1894>
- Sheikhzadeh F, Etamad A, Khoshghadam S, Asl NA, Zare P (2015) Hippocampal BDNF content in response to short- and long-term exercise. *Clin Neurophysiol* 36:1163–1166. <https://doi.org/10.1007/s10072-015-2208-z>
- Sofi F, Valecchi D, Bacci D, Abbate R, Gensini GF, Casini A, Macchi C (2011) Physical activity and risk of cognitive decline: a meta-analysis of prospective studies. *J Intern Med* 269:107–117. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2010.02281.x>
- van Praag H, Christie BR, Sejnowski TJ, Gage FH (1999) Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:13427–13431
- Vaynman S, Ying Z, Gomez-Pinilla F (2003) Interplay between brain-derived neurotrophic factor and signal transduction modulators in the regulation of the effects of exercise on synaptic-plasticity. *Neuroscience* 122:647–657
- Vaynman S, Ying Z, Gomez-Pinilla F (2004) Hippocampal BDNF mediates the efficacy of exercise on synaptic plasticity and cognition. *Eur J Neurosci* 20:2580–2590. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03720.x>
- Vaynman SS, Ying Z, Yin D, Gomez-Pinilla F (2006) Exercise differentially regulates synaptic proteins associated to the function of BDNF. *Brain Res* 1070:124–130. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.11.062>
- Yau SY et al (2011) Hippocampal neurogenesis and dendritic plasticity support running-improved spatial learning and depression-like behaviour in stressed rats. *PLoS One* 6:e24263. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024263>

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

**Résultats complémentaires de l'étude 2 :**

L'impact du traitement à la scopolamine sur la locomotion et l'anxiété des animaux a été évalué respectivement par l'actimétrie et le test d'enfouissement de billes. D'après les résultats de la figure 23, les injections de scopolamine n'impactent pas la locomotion et ne provoquent pas de comportement anxieux chez les animaux SED, EX12 et EX18.

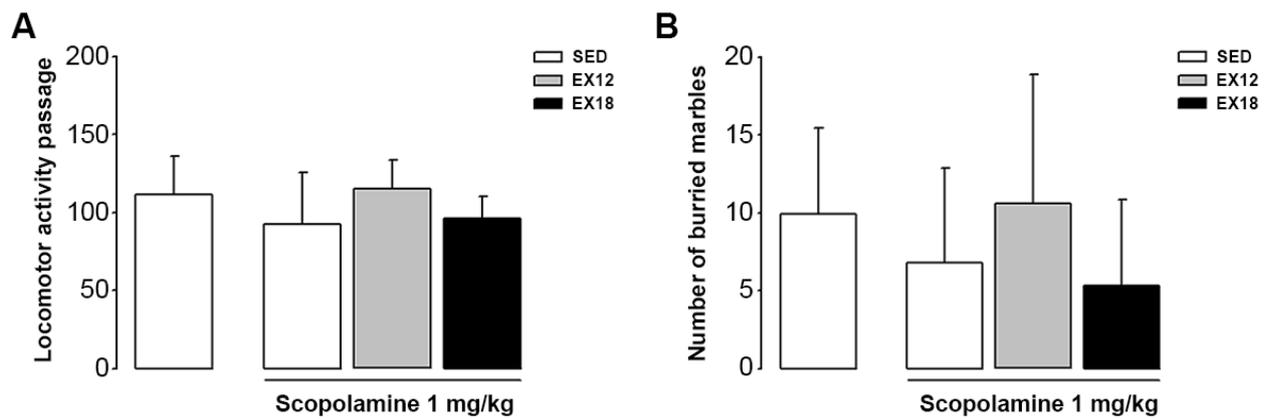


Figure 23 : Impact du traitement à la scopolamine et de l'EX sur la locomotion (A) et l'enfouissement des billes (B).

III. Etude 3 : Troisième publication : Étude de la voie de signalisation du BDNF après un exercice concentrique et excentrique chez le rat

**Titre:**

Brain-derived Neurotrophic Factor Pathway after Downhill and Uphill Training in Rats

**Auteurs:**

Martin Pedard, Marina Cefis, Gaël Ennequin, Aurore Quirié, Philippe Garnier, Anne Prigent-Tessier, Nicolas Pernet, Christine Marie

**Journal:**

Article publié dans Medicine and science in sports and exercise (2018)

DOI: 10.1249/MSS.0000000000001771

PMID: 30157106

## Résumé des travaux

### a. Contexte

Il est maintenant admis que le BDNF est impliqué dans les bienfaits de l'EX sur la cognition. Cependant, les effets de l'intensité de l'EX et du type de contractions musculaires (excentrique/concentrique) ne sont que très peu ou pas étudiés dans la littérature.

### b. Objectifs

Dans ce contexte, les objectifs de ce travail étaient d'une part, 1) d'étudier l'impact de l'intensité de l'EX sur l'expression cérébrale de BDNF, et d'autre part, 2) d'évaluer l'influence des modalités de contractions musculaires sur la voie de signalisation du BDNF d'origine cérébrale.

### c. Protocole expérimental

Ce travail a été divisé en deux études pour répondre aux objectifs précédemment cités. Les études ont été menées chez des rats mâles adultes de la souche WISTAR soumis ou non à un entraînement physique sur un tapis roulant (30 min/j, 7 jours consécutifs).

Pour l'étude de l'intensité de l'EX, les animaux soumis à l'EX ont réalisé le protocole sur un tapis roulant en position horizontale soit à une intensité modérée (vitesse du tapis à 12 m/min) soit à une intensité soutenue (vitesse du tapis à 18 m/min).

Pour évaluer l'influence des modalités de contraction, les animaux ont été soumis au protocole d'EX à sollicitation cardiovasculaire identique (~50% de la VMA), soit sur un tapis en position horizontale, inclinée à +5% (EX concentrique) ou à -10% (EX excentrique).

Les taux protéiques de BDNF, p-TrkB<sup>tyr816</sup>, SYN, p-eNOS<sup>Ser1177</sup> et c-fos ont été évalués par WB dans les régions respectivement impliquées dans la motricité et la cognition, à savoir le cortex sensorimoteur, le cortex préfrontal et l'hippocampe.

### d. Principaux résultats

Les principaux résultats obtenus montrent que les taux protéiques de BDNF, p-eNOS<sup>Ser1177</sup> et c-fos augmentent en fonction de l'intensité de l'EX dans le cortex sensorimoteur. Aucune différence d'activation de la voie BDNF/TrkB et des expressions protéiques de p-eNOS<sup>Ser1177</sup> et

c-fos, n'a été observée entre les animaux soumis à un EX concentrique et ceux soumis à un EX excentrique.

### **Conclusion de l'étude**

Cette étude confirme d'une part, que l'augmentation des taux protéiques de BDNF induite par l'EX dépend de l'intensité. D'autre part, elle apporte la preuve que l'activation de la voie du BDNF en réponse à l'EX ne diffère pas en fonction du type de contractions (excentrique/concentrique). Ces travaux suggèrent que les bénéfices cognitifs des programmes de réhabilitation conçus pour augmenter la force musculaire sont moindres après un EX excentrique de faible intensité par rapport à un EX plus conventionnel de forte intensité.

# Brain-derived Neurotrophic Factor Pathway after Downhill and Uphill Training in Rats

MARTIN PEDARD<sup>1,2</sup>, MARINA CEFIS<sup>1</sup>, GAËL ENNEQUIN<sup>3</sup>, AURORE QUIRIÉ<sup>1</sup>, PHILIPPE GARNIER<sup>1</sup>, ANNE PRIGENT-TESSIER<sup>1</sup>, NICOLAS PERNET<sup>1</sup>, and CHRISTINE MARIE<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INSERM U1093 CAPS, Burgundy and Franche-Comté University, Dijon, FRANCE; <sup>2</sup>Department of Neurology, Regional University Hospital Center of Dijon, Dijon, FRANCE; and <sup>3</sup>EA4267 PEPITE, (EPSI), Burgundy and Franche-Comté University, Besançon, FRANCE

## ABSTRACT

PEDARD, M., M. CEFIS, G. ENNEQUIN, A. QUIRIÉ, P. GARNIER, A. PRIGENT-TESSIER, N. PERNET, and C. MARIE. Brain-derived Neurotrophic Factor Pathway after Downhill and Uphill Training in Rats. *Med. Sci. Sports Exerc.*, Vol. 51, No. 1, pp. 27–34, 2019. **Introduction:** The elevation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in the brain and the subsequent phosphorylation of its cognate tropomyosin-related kinase B (TrkB) receptors at tyrosine 816 (pTrkB<sup>tyr816</sup>) are largely involved in the positive effect of aerobic exercise on brain functioning. Although BDNF levels were reported to increase in proportion with exercise intensity, the effect of the type of contraction is unknown. Therefore, the cerebral BDNF/TrkB pathway was investigated after uphill and downhill treadmill activities at equivalent intensity to preferentially induce eccentric and concentric contractions, respectively. **Methods:** A treadmill activity (30 min d<sup>-1</sup> for seven consecutive days) either in a horizontal position at two different speeds to modulate intensity (experiment 1) or at three different inclinations (null, -10%, and +5%) but at equivalent intensity to modulate the type of contraction (experiment 2) was induced in rats. Both experiments included sedentary rats. Levels of BDNF, pTrkB<sup>tyr816</sup>, synaptophysin (marker of synaptogenesis), endothelial nitric oxide synthase phosphorylated at serine 1177 (peNOS<sup>ser1177</sup>), and c-fos levels (indicators of elevation in blood flow in the cerebrovasculature and neuronal activity, respectively) were measured in motor- and cognition-related brain regions using Western blotting analysis. **Results:** Experiment 1 indicated that treadmill activity induces an intensity-dependent increase in peNOS<sup>ser1177</sup>, c-fos, and BDNF levels. Experiment 2 showed that intensity of exercise as well as activation of the cerebral BDNF pathway, and synaptogenesis did not differ among horizontal, uphill, and downhill treadmill activities. **Conclusion:** The cerebral response of the BDNF pathway to a treadmill activity is dependent on exercise intensity, but not on the type of contraction (eccentric vs concentric). **Key Words:** BDNF PATHWAY, ECCENTRIC, CONCENTRIC, EXERCISE, BRAIN

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is a neurotrophin that plays a key role in the modulation of synapse number and efficacy through phosphorylation of its cognate tropomyosin-related kinase B (TrkB) receptors at tyrosine 816 (1). There is a large consensus for the involvement of the cerebral BDNF in the positive effect of regular physical aerobic exercise on many aspects of brain function including neuroplasticity, learning, and memory (2–4). More precisely, levels of BDNF and TrkB receptors phosphorylated at tyrosine 816 (pTrkB<sup>tyr816</sup>) were reported to be higher in exercised rats compared with sedentary rats (5), with a correlation between BDNF levels and brain function (6). In addition,

anti-BDNF strategies abolished exercise-associated cognitive benefits (7–10). The mechanisms by which exercise increases brain BDNF levels have been poorly investigated. However, neuronal hyperactivity (11,12) and elevation of blood flow in the cerebral vasculature (13) are likely involved. Consistently, exercise-induced elevation of brain BDNF levels was reported to be intensity-dependent (14–16). Of note, the elevation of BDNF levels might also be dependent on exercise duration (17) and frequency (18,19).

Skeletal muscles are capable of performing two types of contractions distinguished by opposing changes in muscle fiber length: lengthening in eccentric (ECC) exercise and shortening in concentric (CON) exercise. The most interesting feature of ECC muscle action is the combination of high muscle force with less energy use. At equivalent intensity, expressed as percentage of maximum of oxygen consumption, it is well documented that ECC produces a higher absolute workload than CON (20). Thus, the intensity of exercise needed to produce a given absolute work is lower for ECC than CON. This explains why ECC exercise is increasingly recognized as a promising strategy to improve muscle strength and consequently functional capacity in patients with cardiorespiratory and neurological diseases or for cancer survivors (21,22), providing eccentric exercises are performed at moderate intensity to avoid muscle damage (23,24). However, although cognition is frequently

Address for correspondence: Martin Pedard, INSERM U1093, UFR des Sciences de Santé, 7 boulevard Jeanne d'Arc, 21000 DIJON, France; E-mail: martinpedard@gmail.com.

Submitted for publication May 2018.

Accepted for publication August 2018.

Supplemental digital content is available for this article. Direct URL citations appear in the printed text and are provided in the HTML and PDF versions of this article on the journal's Web site (www.acsm-msse.org).

0195-9131/19/5101-0027/0

MEDICINE & SCIENCE IN SPORTS & EXERCISE®

Copyright © 2018 by the American College of Sports Medicine

DOI: 10.1249/MSS.0000000000001771

impaired in these patients (25–27), the question of whether the elevation of brain BDNF levels induced by exercise is dependent on the type of contraction has never been explored.

The aim of the present study was to investigate the influence of the type of contraction (eccentric vs concentric) on exercise-induced activation of the brain BDNF pathway and synaptogenesis. For this purpose, levels of BDNF, pTrkB<sup>Y816</sup>, synaptophysin (a marker of synaptogenesis), c-fos (a marker of neuronal activity), and endothelial nitric oxide synthase phosphorylated at serine 1177 (peNOS<sup>ser1177</sup>) (a marker of blood flow in the cerebral microvasculature) were measured in motor- and cognition-related brain regions in sedentary and exercised rats. Downhill and uphill treadmill activities as strategies to preferentially induce ECC and CON exercises, respectively, were performed at equivalent duration (30 min), frequency (once a day for seven consecutive days), and intensity (50% of maximum aerobic speed [MAS]).

## MATERIALS AND METHODS

**Animals.** Experiments were carried out on 10-wk-old Wistar rats ( $n = 42$ ) according to the guidelines of the French Department of Agriculture (license no. 21CAE-102) and approved by the local ethics committee. The experimental procedures were performed in compliance with ARRIVE guidelines. The animals were housed five per cage, kept under a 12-h light–12-h dark cycle, and allowed *ad libitum* access to food and water. The rats were purchased from Janvier (Le Genest Saint Isle, France).

**Treadmill exercise protocol and groups of rats.** After a 1-wk period of habituation to the experimenter and treadmill apparatus, all rats were first subjected to an incremental exercise test “to exhaustion” on a treadmill (by increasing speed from 9 m·min<sup>-1</sup> to exhaustion by step of 3 m·min<sup>-1</sup> for 3 min) to determine their MAS and then to different treadmill activity protocols. The first experiment (experiment 1) was centered on changes in exercise intensity and the second experiment (experiment 2) on changes in the preferential type (eccentric vs concentric) of contraction. Duration and frequency of treadmill activity were fixed at 30 min·d<sup>-1</sup> for seven consecutive days (on the morning) in the two experiments. Indeed, short-lasting (7 d) treadmill aerobic training is sufficient to elevate BDNF levels in the brain (28) and improve cognitive abilities (29), but not long lasting enough to induce cerebral angiogenesis (30). Each experiment included sedentary rats that were kept in a separate cage close to the treadmill apparatus.

For experiment 1 (18 rats), MAS was calculated from an incremental “to exhaustion” using the treadmill in the horizontal position. MAS (m·min<sup>-1</sup>) was found to be 26 ± 4. Two days later, rats were randomized into three groups (six rats each): SED (sedentary rats), LOW (speed of the treadmill fixed at 12 m·min<sup>-1</sup>), and HIGH (speed of the treadmill training fixed at 18 m·min<sup>-1</sup>). Using these conditions, exercise intensity was ~40% and 70% of MAS for LOW and HIGH groups, respectively. For experiment 2 (24 rats), MAS

was calculated from an incremental “to exhaustion” using the treadmill in the horizontal position (on day 1), +5% incline position (on day 2) and -10% incline position (on day 3). MAS (m·min<sup>-1</sup>) was found to be 27 ± 3 for horizontal position, whereas it was 24 ± 3 and 28 ± 3 for positive and negative incline positions, respectively. Two days later, the rats were randomized into the following four groups (six rats each): SED (sedentary rats), HOR (horizontal treadmill position with a speed fixed at 14 m·min<sup>-1</sup>), UP (treadmill slope of +5% and 12 m·min<sup>-1</sup> for speed), and DOWN (treadmill slope of -10% and 14 m·min<sup>-1</sup> for speed). In these conditions, exercise intensity was ~50% of MAS in HOR, UP, and DOWN groups. An overview of experiments 1 and 2 is shown in Figure 1.

**Determination of exercise intensity.** To check that uphill and downhill exercises were well performed at equivalent intensity, we investigated whether exercise-induced elevation of blood flow in the cerebral vasculature as well as neuronal hyperactivity did not differ between UP and DOWN groups. Indeed, neuronal activity and cerebral hemodynamic changes were proportionate with exercise intensity (11,31). Here, elevation of blood flow in the cerebral vasculature and neuronal activity were assessed from biochemical rather than physiological measurements, thus allowing us not only to investigate these parameters in the samples in which the BDNF pathway was investigated but also to reduce the number of rats enrolled in the study. Levels of peNOS<sup>ser1177</sup>, which produces NO levels 10 times higher than unphosphorylated eNOS (32), were used as a marker of blood flow in the cerebral microvasculature (5), whereas c-fos levels were used as a marker of neuronal activity (33,34).

**Collection of samples.** Twenty-four hours after the last treadmill session, rats were anesthetized with chloral hydrate (400 mg·kg<sup>-1</sup>, i.p.; Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) before samples collection. Blood was withdrawn from a cardiac puncture (for experiment 2 only) in tubes containing heparin for further determination of white blood cell counting and formulae. Indeed, eccentric contraction was previously reported to induce elevation of neutrophils count as a result of muscle damage-induced local inflammation (35). Brains were extracted from the skull and dissected into the prefrontal cortex (PFC) and hippocampus (HIP) as cognition-related brain regions and sensorimotor cortex (SMC) as a motor-related brain region. The regions were then frozen at -80°C until Western blot procedure. The soleus and gastrocnemius muscles were also collected and immediately weighed.

**Western blot analysis.** Brain samples were homogenized in seven volumes of ice-cold buffer (100 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl [pH 7.4], 150 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl, 1 mmol·L<sup>-1</sup> ethylene glycol tetraacetic acid, 1% triton X-100, 1% protease inhibitor cocktail [P8340, Sigma-Aldrich], and 1% phosphatase inhibitor cocktail [1066–8304, Fiscer Scientific, Hampton, NH]). After centrifugation, the protein concentration of supernatants was measured using the Lowry method. Equal amounts of protein were resolved by sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis and

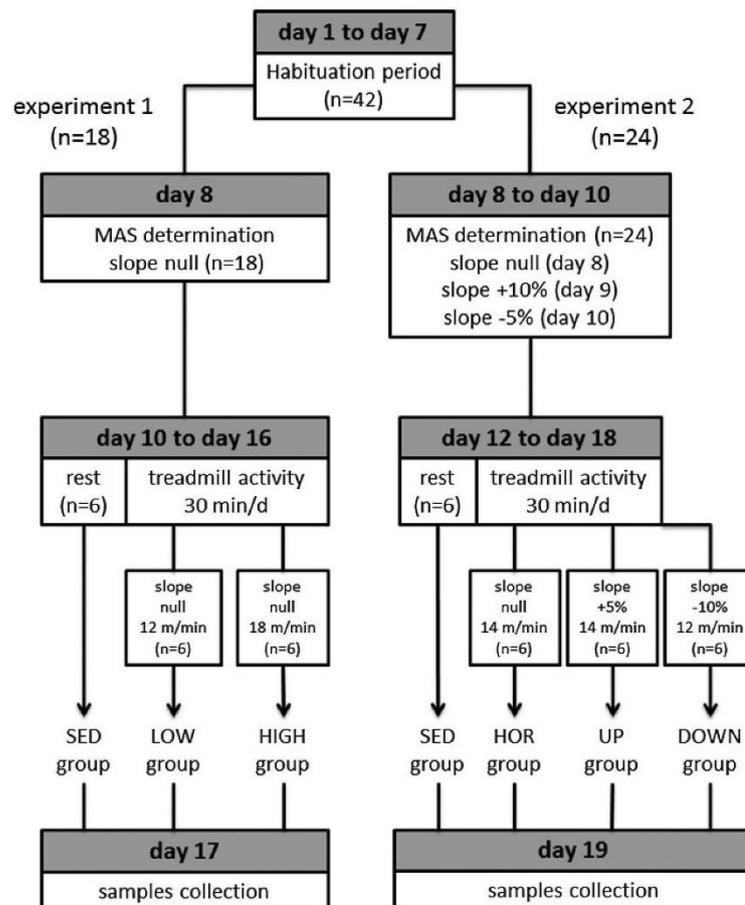


FIGURE 1—Overview of the experimental procedure. In experiment 1, rats ( $n = 18$ ) were subjected or not to a horizontal treadmill activity at different speeds (12 or 18  $\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ ) to modulate exercise intensity. In experiment 2, rats ( $n = 24$ ) were subjected or not to a treadmill activity at different slope (null, +10%, -5%) to modulate the preferential type of contraction. The speed of the treadmill was chosen so that exercise intensity did not differ between exercise regimens. Samples were collected 24 h after the last boot of exercise.  $n =$  number of rats.

electrophoretically transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (0.2 or 0.45  $\mu\text{m}$ ) for western blotting. After blocking nonspecific binding sites with a 5% solution of nonfat dry milk in Tris-buffered saline (20 mM Tris/HCl, 137 mM NaCl, pH 7.4) containing 0.1% Tween 20 (TBST), membranes were probed with an anti-BDNF rabbit monoclonal antibody (1/3000 in TBST with 5% nonfat dry milk, ab108319; Abcam, Cambridge, United Kingdom) to detect the mature form of BDNF, an anti-pTrkB<sup>tyr816</sup> rabbit monoclonal antibody (1/1000 in TBST with 7.5% BSA, ABN 1381; Merck Millipore, Burlington, MA) was used to detect pTrkB<sup>tyr816</sup> (a marker of activation of TrkB receptor by the mature form of BDNF), an anti-synaptophysin rabbit polyclonal antibody (1/3000 in TBST, RB-1461-P1; Interchim, Montluçon, France) was used to detect synaptophysin (a marker of the synapse number), an anti-peNOS<sup>ser1177</sup> mouse monoclonal antibody (1/1000 with in TBST 7.5% BSA, 612383; BD Biosciences,

San Jose, CA) was used to detect peNOS<sup>ser1177</sup> (a marker of endothelial NO overproduction), an anti-c-fos mouse monoclonal antibody (1/1000 in TBST, sc-166940; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX) was used to detect c-fos (a marker of neuronal activity), or an anti- $\beta$ -actin antibody (1/10000 in TBST, A5441, Sigma-Aldrich), which was used here as an internal control. Then membranes were incubated with secondary antibodies conjugated with horseradish peroxidase (111-035-144 [antirabbit, 1/30,000 in TBST] and 115-035-166 [antimouse, 1/50,000 in TBST]; Jackson ImmunoResearch Laboratories, Interchim, Montluçon, France). Protein-antibody complexes were visualized using the enhanced chemiluminescence Western blotting detection system manually (ECL 2, 1151-7371; Fisher Scientific, Illkirch, France). The band densities (Optical Density values) were determined by scanning densitometry (GS-800; Bio-Rad Laboratories, Ivry sur Seine, France). Two groups of rats were simultaneously analyzed on the same gel,

TABLE 1. Baseline characteristics.

|      | Body Weight (g) |                | Muscle Weight (mg) |               | Neutrophils<br>Count (% of Leukocytes) | Leukocytes<br>Count ( $10^9 \text{ L}^{-1}$ ) |
|------|-----------------|----------------|--------------------|---------------|--|---|
|      | Before Training | After Training | Soleus             | Gastrocnemius |  |   |
| SED  | 309 ± 25        | 336 ± 28       | 140 ± 16           | 387 ± 60      | –                                      | –   |
| LOW  | 307 ± 15        | 333 ± 19       | 170 ± 30           | 403 ± 29      | –                                      | –   |
| HIGH | 306 ± 11        | 331 ± 21       | 161 ± 18           | 401 ± 68      | –                                      | –   |
| SED  | 330 ± 13        | 363 ± 19       | 170 ± 15           | 453 ± 95      | 3.4 ± 0.2                              | 14.8 ± 2.3                                    |
| HOR  | 331 ± 27        | 358 ± 27       | 164 ± 16           | 393 ± 50      | 3.2 ± 0.7                              | 12.6 ± 3.5                                    |
| UP   | 329 ± 38        | 359 ± 48       | 175 ± 42           | 470 ± 105     | 3.0 ± 1.1                              | 13.4 ± 2.9                                    |
| DOWN | 310 ± 10        | 330 ± 21       | 159 ± 21           | 397 ± 34      | 5.3 ± 1.0***                           | 13.1 ± 3.9                                    |

Body weight was measured before and after aerobic training. Samples (muscles and blood) were collected in sedentary rats (SED groups) or trained rats (LOW, HIGH, HOR, UP, and DOWN groups). Values are expressed as mean ± SD from six rats.  
\*\*\* $P < 0.001$ .

and gels were run in triplicate. Data were analyzed from a representative gel. See supplemental data for identification of each protein of interest from a whole membrane [see Figure, Supplemental Digital Content 1, Immunoblots of A) BDNF (14 kDa), B) pTrkB<sup>tyr816</sup> (145 kDa), C) synaptophysin (38 kDa), D) peNOS<sup>ser1177</sup> (130 kDa), E) c-fos (41 kDa), <http://links.lww.com/MSS/B389>].

**Data and statistical analysis.** Values were expressed as mean ± SD. Comparison between two groups was performed using a parametric *t*-test or nonparametric Mann–Whitney test, depending on normality and equal variance tests. Comparisons between multiple groups were assessed with the one-way ANOVA or nonparametric Kruskal–Wallis test, depending on normality, and equal variance tests followed by a Bonferroni adjustment. A *P* value of  $<0.05$  was considered statistically significant.

## RESULTS

**Baseline characteristics.** The baseline characteristics are summarized in Table 1. There was no significant difference in body and muscle weight among SED, LOW, and HIGH groups either before or after exercise training. Again, no significant difference in these parameters was observed among SED, HOR, UP, and DOWN groups either before or after exercise training. Notably, as expected (35), neutrophil count was higher in DOWN compared with the other experiment 2 groups. However, this effect did not translate into a difference in total leukocyte count because neutrophils only make up a minor fraction of leukocytes in rats. According to baseline hematology data for Wistar rats (<https://www.criver.com/sites/default/files/resources/BaselineHematologyandClinicalChemistryValuesforCharlesRiverWistarRats%5BCrIWIWR%5DasaFunctionofSexandAgeSpring1998.pdf>), only 2% to 22% of white blood cells are neutrophils. In the present study, this percentage was ~3% in the SED, HOR, and UP groups, but reached ~5% in the DOWN group ( $P < 0.001$ ).

**Uphill and downhill training were performed at equivalent intensity.** We first validated c-fos and peNOS<sup>ser1177</sup> levels as reliable markers of treadmill activity intensity. For this purpose, we compared these proteins in SED, LOW, and HIGH groups. As expected and shown in Table 2, elevations of c-fos and peNOS<sup>ser1177</sup> levels were lower in the LOW group (+62% for both protein) than that in the HIGH group (+135% for c-fos and +100% for peNOS<sup>ser1177</sup>). Then we

checked that downhill and uphill exercises were performed at equivalent intensity by comparing c-fos and peNOS<sup>ser1177</sup> among UP and DOWN groups. As shown in Figure 2, peNOS<sup>ser1177</sup> (Fig. 2A) and c-fos (Fig. 2B) levels did not differ between UP and DOWN groups in PFC, HIP, and SMC, indicating that uphill and downhill exercises were well performed at equivalent intensity.

**Uphill and downhill training stimulate the BDNF pathway to the same extent.** Rats of SED group ( $n = 6$ ) were first compared with rats of HOR, UP, or DOWN group ( $n = 6$  each) on a same gel. Physical training, irrespective of the slope of the treadmill, resulted in a significant increase of BDNF, pTrkB<sup>tyr816</sup>, and synaptophysin levels in the PFC, HIP, and SMC (Table 3). Importantly, when rats of the UP and DOWN groups were simultaneously analyzed on a same gel, there were no significant difference in BDNF (Fig. 3A), pTrkB<sup>tyr816</sup> (Fig. 3B) and synaptophysin (Fig. 3C) levels between the groups for PFC, HIP, and SMC. Collectively, these data show that downhill and uphill trainings performed at equivalent intensity stimulated the BDNF/TrkB pathway to the same extent, irrespective of the brain region examined. Finally, we investigated the effect of exercise intensity on brain BDNF levels. As shown in Table 2, brain BDNF levels increased proportionally to exercise intensity (+76% after low intensity and +149% after high intensity), a result that was confirmed with the comparison of rats of LOW and HIGH groups on a same gel. Indeed, BDNF (relative optical density), which was  $1.04 \pm 0.50$  in the LOW group, went up to  $1.99 \pm 0.63$  in the HIGH group ( $P < 0.01$ , not shown).

## DISCUSSION

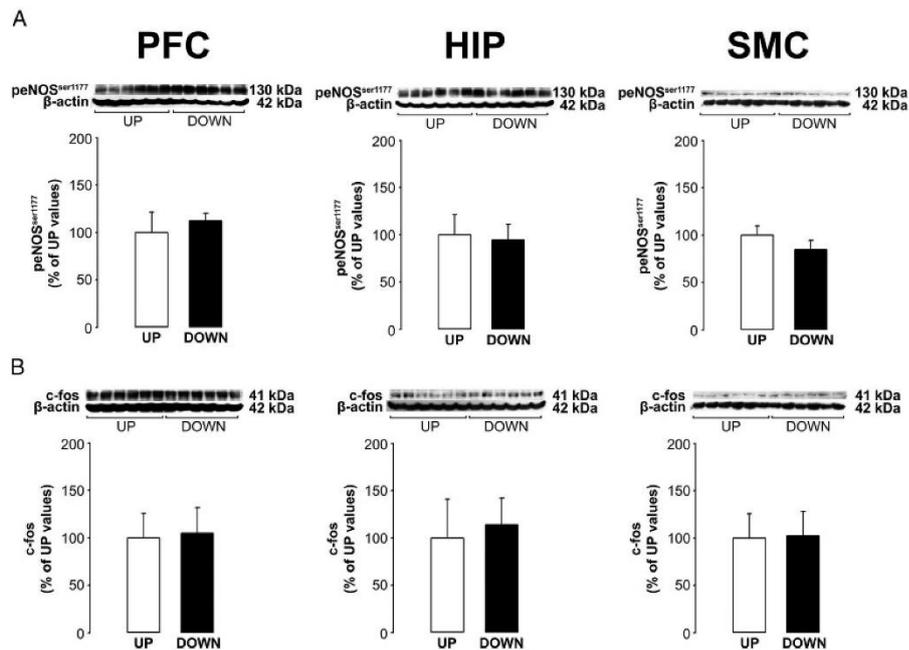
The present study shows that elevation of brain BDNF levels is higher after horizontal treadmill activity ( $30 \text{ min} \cdot \text{d}^{-1}$

TABLE 2. Effect of training intensity on c-fos, peNOS<sup>ser1177</sup>, and BDNF in SMC.

|      | c-fos          | peNOS <sup>ser1177</sup> | BDNF          |
|------|----------------|--------------------------|---------------|
| SED  | 0.77 ± 0.16    | 0.83 ± 0.32              | 0.87 ± 0.24   |
| LOW  | 162.7 ± 42.5** | 162.0 ± 39.2*            | 176.3 ± 58.7* |
| SED  | 0.72 ± 0.33    | 1.57 ± 0.37              | 0.76 ± 0.20   |
| HIGH | 235.0 ± 62.4** | 200.2 ± 48.2**           | 248.5 ± 60.2* |

c-fos, peNOS<sup>ser1177</sup>, and BDNF levels were assessed by Western blot analysis in the SMC of sedentary rats (SED group) and trained rats at low ( $12 \text{ m} \cdot \text{min}^{-1}$ , LOW group) or high ( $18 \text{ m} \cdot \text{min}^{-1}$ , HIGH group) intensity. Levels (mean ± SD) were expressed as relative optical density for the SED group ( $n = 6$ ) and as percent of SED values for LOW and HIGH groups ( $n = 6$  each).

\* $P < 0.05$ .  
\*\* $P < 0.01$ .



**FIGURE 2**—Endothelial nitric oxide synthase phosphorylated at serine 1177 (peNOS<sup>ser1177</sup>) (A) and c-fos (B) levels in the PFC, HIP, and SMC in rats trained on a treadmill inclined at either +5% (UP group) or -10% (DOWN group). Corresponding immunoblots of proteins of interest and β-actin as internal control are shown above the bar graphs. Values are expressed as mean ± SD from six rats.

for seven consecutive days) at high intensity (70% of MAS) than after treadmill activity at low intensity (30% of maximum aerobic intensity) and validates changes in cerebral peNOS<sup>ser1177</sup> (a marker of blood flow in the cerebral microvasculature) and c-fos (a marker of neuronal activation) levels as reliable markers of exercise intensity (experiment 1). It also reveals (experiment 2) that levels of BDNF, activated TrkB receptors, synaptophysin, peNOS<sup>ser1177</sup>, and c-fos in the PFC, HIP, or SMC do not

differ between downhill and uphill treadmill activities when performed at equivalent duration (30 min), frequency (once a day for seven consecutive days), and intensity (50% of MAS), indicating that the cerebral response to exercise is independent on the type of contraction.

Our results are in line with the plethora of studies reporting that treadmill activity stimulates the cerebral BDNF pathway and with less abundant studies reporting that treadmill exercise

**TABLE 3.** Effect of eccentric vs concentric contraction on BDNF, pTrkB<sup>tyr816</sup>, and synaptophysin levels.

|     |      | BDNF            | pTrkB <sup>tyr816</sup> | Synaptophysin   |
|-----|------|-----------------|-------------------------|-----------------|
| PFC | SED  | 0.82 ± 0.23     | 1.57 ± 0.16             | 0.97 ± 0.20     |
|     | HOR  | 155.8 ± 28.4**  | 137.8 ± 10.8***         | 143.5 ± 17.8**  |
|     | SED  | 2.66 ± 0.16     | 0.74 ± 0.26             | 0.77 ± 0.33     |
|     | UP   | 142.3 ± 19.4**  | 141.7 ± 19.7*           | 161.1 ± 9.9**   |
|     | SED  | 3.07 ± 0.70     | 0.66 ± 0.26             | 0.76 ± 0.04     |
| HIP | DOWN | 149.9 ± 19.9**  | 153.4 ± 22.0*           | 129.6 ± 24.2*   |
|     | SED  | 0.54 ± 0.11     | 1.52 ± 0.14             | 0.89 ± 0.34     |
|     | HOR  | 145.0 ± 26.6*   | 145.1 ± 16.3***         | 165.7 ± 34.0*   |
|     | SED  | 0.45 ± 0.21     | 1.23 ± 0.25             | 1.19 ± 0.18     |
|     | UP   | 209.6 ± 24.2**  | 181.2 ± 23.1**          | 143.5 ± 21.9**  |
| SMC | SED  | 0.31 ± 0.13     | 1.05 ± 0.25             | 1.16 ± 0.21     |
|     | DOWN | 185.3 ± 31.4*   | 170.9 ± 12.4**          | 135.4 ± 19.7**  |
|     | SED  | 0.91 ± 0.19     | 0.77 ± 0.17             | 0.66 ± 0.14     |
|     | HOR  | 155.7 ± 21.0*   | 142.1 ± 33.8*           | 173.9 ± 40.0**  |
|     | SED  | 0.44 ± 0.05     | 0.70 ± 0.22             | 0.56 ± 0.18     |
|     | UP   | 149.5 ± 23.0*   | 134.6 ± 19.4*           | 135.4 ± 19.7**  |
|     | SED  | 0.42 ± 0.04     | 0.38 ± 0.17             | 0.65 ± 0.06     |
|     | DOWN | 159.5 ± 21.0*** | 138.3 ± 25.5*           | 155.3 ± 11.7*** |

BDNF, pTrkB<sup>tyr816</sup>, and synaptophysin levels were assessed by Western blot analysis in the PFC, HIP, and SMC of sedentary rats (SED group) and rats subjected to a treadmill activity with a slope either null (HOR group), fixed at +5% (UP group) or at -10% (DOWN group). Levels (mean ± SD) were expressed as relative optical density for SED group ( $n = 6$ ) and as % of SED values for UP and DOWN groups ( $n = 6$  each).

\* $P < 0.05$ .

\*\* $P < 0.01$ .

\*\*\* $P < 0.001$ .

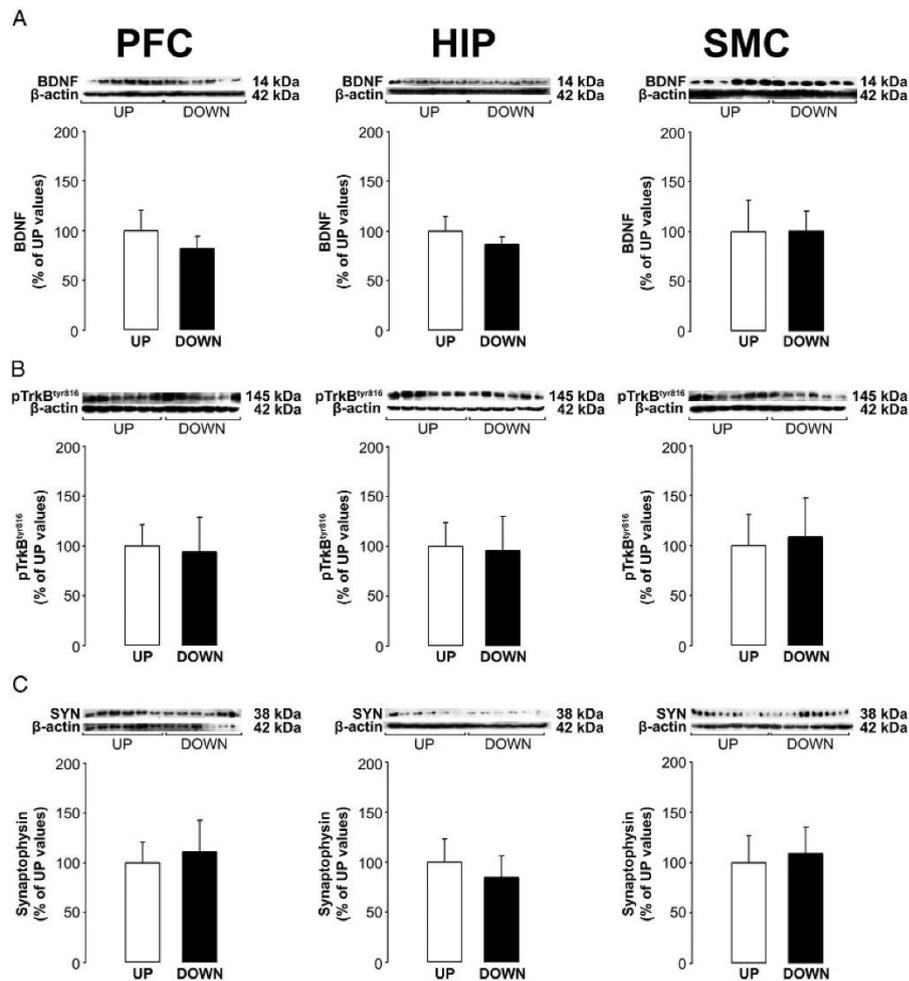


FIGURE 3—BDNF (A), tropomyosin-related kinase receptor phosphorylated at tyrosine 816 (pTrkB<sup>tyr816</sup>) (B), and synaptophysin (SYN) (C) levels in the PFC, HIP, and SMC in rats trained on a treadmill inclined at either +5% (UP group) or -10% (DOWN group). Corresponding immunoblots of proteins of interest and  $\beta$ -actin as internal control are shown above the bar graphs. Values are expressed as mean  $\pm$  SD from six rats.

increase brain BDNF levels in an intensity-dependent manner (see Introduction). The new data provided here are that aerobic exercise-induced stimulation of the BDNF pathway and resulting synaptogenesis induction either in motor- or in cognition-related brain regions is independent of the type of contraction. Notably, uphill and downhill exercises were performed at moderate intensity (50% of MAS) to avoid eccentric contraction-induced muscle damage (23,24) and also to circumvent the potential inhibitory effect of stress (increased circulating corticosterone levels) on the BDNF pathway (36) at least in the HIP, which is rich in glucocorticoid receptors (37,38). However, the number of circulating neutrophils as an index of muscle damage was higher in rats subjected to downhill exercise than that in rats subjected to uphill and horizontal exercise (Table 1), suggesting that muscle damage occurred in rats subjected to

our protocol of eccentric training. Assuming that cognitive abilities depend on brain BDNF levels (7–10), the equal activation of the BDNF pathway for uphill and downhill exercise suggests that both kinds of exercise might benefit cognition with the same magnitude, at least when performed at equivalent submaximal intensity. However, in the context of physical rehabilitation for increase muscle strength, eccentric exercise is generally introduced at a lower intensity than more traditional exercises. Our results highlight the possibility that the prescription of eccentric exercise at low intensity rather than concentric exercise at higher intensity is disadvantageous in terms of cognitive benefits. Therefore, we think that clinical studies designed to specifically compare cognitive abilities after eccentric versus more traditional exercise is urgently required before eccentric exercise is advised for rehabilitation of restrained patients. We

also think that exercise intensity needs to be considered for the interpretation of the results in these studies.

The mechanisms by which aerobic exercise increases brain BDNF levels have been poorly investigated. However, neuronal hyperactivity (11,12) and increased blood flow in the cerebral vasculature (13) seem to be important contributing factors. Consistently, uphill and downhill training that induced an equivalent increase in c-fos and peNOS<sup>ser1177</sup> levels were reported here to result in similar BDNF upregulation. In the same way, exercise at high intensity that induced a higher elevation in c-fos and peNOS<sup>ser1177</sup> levels than exercise at low intensity also resulted in a higher BDNF elevation. The literature contains limited evidence on how the cortical regions in the motor network are activated during eccentric muscle action (39). It is unlikely that afferent fibers sensitive to force production contributes to neuronal hyperactivity occurring during exercise as downhill and uphill treadmill activity increased cerebral c-fos levels to a same extent, whereas force production is higher during eccentric than during concentric contraction. These data resonate with a previous study in which a single session of either uphill or downhill treadmill activity (at equivalent submaximal intensity) was reported to increase cortical excitability equally (40). As regards cerebral hemodynamic changes occurring during exercise, our results on peNOS<sup>ser1177</sup> confirm that blood flow elevation during aerobic exercise engaging a large body mass occurs in both motor-related (41) and motor-unrelated brain regions (42). Lastly, although there is an increasing interest in the contributing role of the myokines IGF-1 and irisin in exercise-induced elevated brain BDNF levels (43,44), the mechanism that control myokines synthesis and secretion by contractile cells is unknown. The observed lack of difference in brain

BDNF levels between uphill- and downhill-exercised rats supports the notion that myokines synthesis/secretion is independent of force production.

In conclusion, the present study confirms that brain BDNF elevation induced by exercise is intensity-dependent and provides the first evidence that exercise-induced activation of the cerebral BDNF pathway is independent of the type of contraction (eccentric vs concentric). This new finding suggests that the cognitive benefits of rehabilitation programs designed to increase muscle strength might be lower after eccentric exercise at low intensity than after more conventional exercise at higher intensity. It may also help to better understand the mechanisms involved in muscle contraction-induced elevation of brain BDNF levels. Our future work will be to investigate behavioral aspects (learning, memory) in rats subjected to uphill versus downhill treadmill activity performed at equivalent intensity.

The authors thank Suzanne Rankin for English revision. Authors declare that the results are presented clearly, honestly, and without fabrication, falsification, or inappropriate data manipulation and state that results of the present study do not constitute endorsement by the American College of Sports Medicine.

There is no conflict of interest with regard to the work that was supported by funding from the University of Bourgogne and Franche Comté and INSERM.

All authors were involved in drafting the article, and all authors approved the final version to be published. Pedard had full access to all of the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

Significant manuscript writer: Pedard and Marie; significant manuscript reviewer/reviser: Quirié, Tessier, Garnier, Cefis, Ennequin, and Pernet; concept and design: Marie, Tessier, and Garnier; data acquisition: Pedard, Cefis, Quirié, Ennequin, and Pernet; data analysis and interpretation: Pedard, Cefis, and Marie; statistical expertise: Pedard and Marie.

## REFERENCES

1. Bathina S, Das UN. Brain-derived neurotrophic factor and its clinical implications. *Arch Med Sci*. 2015;11(6):1164–78.
2. Neeper SA, Gomez-Pinilla F, Choi J, Cotman C. Exercise and brain neurotrophins. *Nature*. 1995;373(6510):109.
3. Cassilhas RC, Tufik S, de Mello MT. Physical exercise, neuroplasticity, spatial learning and memory. *Cell Mol Life Sci*. 2016;73(5):975–83.
4. Stimpson NJ, Davison G, Javadi AH. Joggin' the noggin: towards a physiological understanding of exercise-induced cognitive benefits. *Neurosci Biobehav Rev*. 2018;88:177–86.
5. Banoujaafar H, Monnier A, Pernet N, et al. Brain BDNF levels are dependent on cerebrovascular endothelium-derived nitric oxide. *Eur J Neurosci*. 2016;44(5):2226–35.
6. Berchtold NC, Castello N, Cotman CW. Exercise and time-dependent benefits to learning and memory. *Neuroscience*. 2010;167(3):588–97.
7. Vaynman S, Ying Z, Gomez-Pinilla F. Hippocampal BDNF mediates the efficacy of exercise on synaptic plasticity and cognition. *Eur J Neurosci*. 2004;20(10):2580–90.
8. Gomez-Pinilla F, Vaynman S, Ying Z. Brain-derived neurotrophic factor functions as a metabotrophin to mediate the effects of exercise on cognition. *Eur J Neurosci*. 2008;28(11):2278–87.
9. Liu YF, Chen HI, Yu L, et al. Upregulation of hippocampal TrkB and synaptotagmin is involved in treadmill exercise-enhanced aversive memory in mice. *Neurobiol Learn Mem*. 2008;90(1):81–9.
10. Gerecke KM, Jiao Y, Pagala V, Smeyne RJ. Exercise does not protect against MPTP-induced neurotoxicity in BDNF haploinsufficient mice. *PLoS One*. 2012;7(8):e43250.
11. Czurko A, Hirase H, Csicsvari J, Buzsáki G. Sustained activation of hippocampal pyramidal cells by 'space clamping' in a running wheel. *Eur J Neurosci*. 1999;11(1):344–52.
12. Querido JS, Sheel AW. Regulation of cerebral blood flow during exercise. *Sports Med*. 2007;37(9):765–82.
13. Banoujaafar H, Van Hoecke J, Mossiat CM, Marie C. Brain BDNF levels elevation induced by physical training is reduced after unilateral common carotid artery occlusion in rats. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2014;34(10):1681–7.
14. de Almeida AA, Gomes da Silva S, Fernandes J, et al. Differential effects of exercise intensities in hippocampal BDNF, inflammatory cytokines and cell proliferation in rats during the postnatal brain development. *Neurosci Lett*. 2013;553:1–6.
15. Lou SJ, Liu JY, Chang H, Chen PJ. Hippocampal neurogenesis and gene expression depend on exercise intensity in juvenile rats. *Brain Res*. 2008;1210:48–55.

16. Shih PC, Yang YR, Wang RY. Effects of exercise intensity on spatial memory performance and hippocampal synaptic plasticity in transient brain ischemic rats. *PLoS One*. 2013;8(10):e78163.
17. Sheikhzadeh F, Etemad A, Khoshghadam S, Asl NA, Zare P. Hippocampal BDNF content in response to short- and long-term exercise. *Neurol Sci*. 2015;36(7):1163–6.
18. Costa MS, Ardais AP, Fioreze GT, et al. The impact of the frequency of moderate exercise on memory and brain-derived neurotrophic factor signaling in young adult and middle-aged rats. *Neuroscience*. 2012;222:100–9.
19. Dalise S, Cavalli L, Ghuman H, et al. Biological effects of dosing aerobic exercise and neuromuscular electrical stimulation in rats. *Sci Rep*. 2017;7(1):10830.
20. Pokora I, Kempa K, Chrapusta SJ, Langfort J. Effects of downhill and uphill exercises of equivalent submaximal intensities on selected blood cytokine levels and blood creatine kinase activity. *Bio Sport*. 2014;31(3):173–8.
21. Isner-Horobeti ME, Dufour SP, Vautravers P, Geny B, Coudeyre E, Richard R. Eccentric exercise training: modalities, applications and perspectives. *Sports Med*. 2013;43(6):483–512.
22. LaStayo P, Marcus R, Dibble L, Frajacomo F, Lindstedt S. Eccentric exercise in rehabilitation: safety, feasibility, and application. *J Appl Physiol*. 2014;116(11):1426–34.
23. Peake J, Nosaka K, Suzuki K. Characterization of inflammatory responses to eccentric exercise in humans. *Exerc Immunol Rev*. 2005;11:64–85.
24. Kanda K, Sugama K, Hayashida H, et al. Eccentric exercise-induced delayed-onset muscle soreness and changes in markers of muscle damage and inflammation. *Exerc Immunol Rev*. 2013;19:72–85.
25. Pendergrass JC, Targum SD, Harrison JE. Cognitive impairment associated with cancer: a brief review. *Innov Clin Neurosci*. 2018;15(1–2):36–44.
26. Ozyemisci-Taskiran O, Bozkurt SO, Kokturk N, Karatas GK. Is there any association between cognitive status and functional capacity during exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease? *Chron Respir Dis*. 2015;12(3):247–55.
27. Sun J-H, Tan L, Yu J-T. Post-stroke cognitive impairment: epidemiology, mechanisms and management. *Ann Transl Med*. 2014;2(8):80.
28. Quirie A, Hervieu M, Garnier P, et al. Comparative effect of treadmill exercise on mature BDNF production in control versus stroke rats. *PLoS One*. 2012;7(9):e44218.
29. O'Callaghan RM, Ohle R, Kelly AM. The effects of forced exercise on hippocampal plasticity in the rat: a comparison of LTP, spatial- and non-spatial learning. *Behav Brain Res*. 2007;176(2):362–6.
30. Ding YH, Luan XD, Li J, et al. Exercise-induced overexpression of angiogenic factors and reduction of ischemia/reperfusion injury in stroke. *Curr Neurovasc Res*. 2004;1(5):411–20.
31. Sato K, Ogoh S, Hirasawa A, Oue A, Sadamoto T. The distribution of blood flow in the carotid and vertebral arteries during dynamic exercise in humans. *J Physiol*. 2011;589(Pt 11):2847–56.
32. Corson MA, James NL, Latta SE, Nerem RM, Berk BC, Harrison DG. Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress. *Circ Res*. 1996;79(5):984–91.
33. Shizuki K, Ogawa K, Matsunobu T, Kanzaki J, Ogita K. Expression of c-Fos after noise-induced temporary threshold shift in the guinea pig cochlea. *Neurosci Lett*. 2002;320(1–2):73–6.
34. Kovacs KJ. c-Fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional map. *Neurochem Int*. 1998;33(4):287–97.
35. Smith LL, McCammon M, Smith S, Chamness M, Israel RG, O'Brien KF. White blood cell response to uphill walking and downhill jogging at similar metabolic loads. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*. 1989;58(8):833–7.
36. Trivino-Paredes J, Patten AR, Gil-Mohapel J, Christie BR. The effects of hormones and physical exercise on hippocampal structural plasticity. *Front Neuroendocrinol*. 2016;41:23–43.
37. Ahima RS, Harlan RE. Charting of type II glucocorticoid receptor-like immunoreactivity in the rat central nervous system. *Neuroscience*. 1990;39(3):579–604.
38. de Kloet ER, Reul JM, Sutanto W. Corticosteroids and the brain. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1990;37(3):387–94.
39. Perrey S. Brain activation associated with eccentric movement: a narrative review of the literature. *Eur J Sport Sci*. 2018;18(1):75–82.
40. Garnier YM, Lepers R, Stapley PJ, Papaxanthis C, Paizis C. Changes in cortico-spinal excitability following uphill versus downhill treadmill exercise. *Behav Brain Res*. 2017;317:242–50.
41. Olesen J. Contralateral focal increase of cerebral blood flow in man during arm work. *Brain*. 1971;94(4):635–46.
42. Nishijima T, Soya H. Evidence of functional hyperemia in the rat hippocampus during mild treadmill running. *Neurosci Res*. 2006;54(3):186–91.
43. Carro E, Nunez A, Busiguina S, Torres-Aleman I. Circulating insulin-like growth factor I mediates effects of exercise on the brain. *J Neurosci*. 2000;20(8):2926–33.
44. Wrann CD, White JP, Salogiannis J, et al. Exercise induces hippocampal BDNF through a PGC-1 $\alpha$ /FNDC5 pathway. *Cell Metab*. 2013;18(5):649–59.

#### IV. Etude 4 : Expression et caractérisation du BDNF dans le muscle squelettique

Comme indiqué dans la partie C du manuscrit, le muscle, via des myokines, participerait aux effets neuroplastiques induits par l'EX. Dans cette dernière étude, non publiée mais ayant fait l'objet d'une communication scientifique, nous nous intéressons à l'impact de l'intensité de l'EX sur les expressions musculaires de BDNF et du précurseur de l'irisine, le FNDC5. En parallèle, la caractérisation du type cellulaire à l'origine de l'expression musculaire de BDNF est également en cours de réalisation chez des rats SED.

##### 1. Impact de l'intensité de l'EX sur les expressions de BDNF et FNDC5 dans le muscle squelettique

###### a. Contexte de l'expérience

Les mécanismes à l'origine de l'augmentation du BDNF cérébral en fonction de l'intensité de l'EX ne sont pas clairement définis. Bien que des travaux préliminaires (cf. Etude 2) aient montré une augmentation à la fois des marqueurs du flux sanguin cérébral ( $p\text{-eNOS}^{\text{Ser1177}}$ ) et de l'activité neuronale (*c-fos*), l'implication du muscle n'a pas été investiguée. De plus, l'effet de l'intensité de l'EX sur l'expression musculaire du précurseur de la myokine irisine, le FNDC5, n'a jamais été étudié.

###### b. Objectifs

Les objectifs de ce travail sont 1) de déterminer l'effet de l'intensité de l'EX sur les expressions protéiques de BDNF et FNDC5 dans les muscles soléaires et gastrocnémiens, 2) de comparer les expressions musculaires de BDNF et FNDC5 entre ces deux muscles, et enfin 3) d'étudier le lien entre les expressions protéiques de BDNF cérébral et de FNDC5 musculaire.

###### c. Protocole expérimental

Ce travail a été mené sur les rats mâles adultes de la souche WISTAR de l'étude 2, SED ou soumis à un EX imposé d'intensité modérée (EX12) ou soutenue (EX18) (cf. détail du protocole d'EX dans l'étude 2). L'étude a été conduite sur deux muscles ayant une répartition de fibres musculaires différentes : le muscle soléaire présentant 80% de fibres lentes et 20% de fibres rapides, et le muscle gastrocnémien contenant seulement 5% de fibres lentes et 95% de

fibres rapides (Eng *et al.* 2008). Ces deux muscles ont été prélevés chez les rats des groupes SED, EX12, EX18 et ont été homogénéisés selon la méthode décrite dans la section matériels et méthodes de l'étude 2, excepté une étape supplémentaire d'homogénéisation, réalisée à l'Ultraturrax (1 à 2 min). Les expressions protéiques de BDNF et FNDC5 ont été mesurées par WB (cf. matériels et méthodes de l'étude 2), après mise au point des conditions expérimentales optimales pour l'utilisation de l'anticorps FNDC5. L'expression protéique de BDNF a également été quantifiée par la méthode ELISA, selon le protocole du fournisseur (BEK-2211-1P/2P, Biosensis). Les informations concernant les anticorps utilisés pour la technique de WB sont résumées dans le tableau 2.

Tableau 2 : Liste des anticorps primaires et secondaires utilisés pour la technique de WB

| Protéine cible                    | Anticorps primaire (I')  | Anticorps secondaire (II')  |
|-----------------------------------|--|---|
| <b>BDNF</b>                       | Anti- BDNF (1/3000 + 5% de régilait, rabbit, monoclonal, ab108319, Abcam)  | HRP anti- rabbit (1/30 000, rabbit, 111-035-144, Jackson ImmunoResearch Laboratories) |
| <b>FNDC5</b>                      | Anti- FNDC5 (1/5000 + 5% de régilait, rabbit, monoclonal, ab174833, Abcam) | HRP anti- rabbit (1/20 000, rabbit, 111-035-144, Jackson ImmunoResearch Laboratories) |
| <b><math>\alpha</math>-actine</b> | Anti- $\alpha$ -actine (1/10 000, mouse monoclonal, ab28052, Abcam)        | HRP anti- mouse (1/50 000, mouse, 115-035-166, Jackson ImmunoResearch Laboratories)   |

Dans un premier temps, des comparaisons deux à deux des groupes SED, EX12 et EX18 ont été effectuées pour évaluer l'impact de l'intensité de l'EX dans le muscle soléaire puis dans le muscle gastrocnémien. Dans un second temps, une étude comparative a été menée afin de comparer les expressions de BDNF et FNDC5 entre les muscles soléaires et gastrocnémiens en conditions SED et exercée (EX12, EX18). La technique ELISA a été utilisée afin de comparer sur une même plaque, l'ensemble des échantillons de muscles soléaires et gastrocnémiens.

#### d. Résultats

Les expressions protéiques de BDNF et FNDC5 ont été mesurées dans les muscles soléaires et gastrocnémiens de rats SED, EX12 et EX18. L'effet de l'intensité de l'EX sur les taux

protéiques de BDNF et FNDC5 est respectivement représenté dans les figures 24 et 25. Les comparaisons tissulaires entre les muscles soléaires et gastrocnémiens pour les expressions protéiques de BDNF et FNDC5 sont représentées dans la figure 24 et le tableau 3. L'étude étant en cours de réalisation, l'effet de l'intensité de l'EX sur l'expression protéique de FNDC5 dans le muscle gastrocnémien ne sera pas présenté dans ce manuscrit.

Aucun effet de l'EX, quelle que soit l'intensité, n'a été observé sur les taux protéiques de BDNF dosés par ELISA dans les muscles soléaires et gastrocnémiens (Figure 24). Puisque la technique ELISA ne permet pas de discriminer la forme précurseur de la forme mature du BDNF, l'expression protéique de BDNF a été également investiguée par WB, afin de quantifier exclusivement la forme mature (14 kDa). Les résultats (non présentés) sont en accord avec les données obtenues par ELISA. Dans le muscle soléaire, les taux musculaires de FNDC5 sont significativement augmentés lorsque les groupes EX12 et EX18 sont comparés au groupe SED (Figure 25). Néanmoins, aucune différence significative n'a été obtenue lorsque les deux intensités d'EX ont été comparées sur un même blot. Concernant le muscle gastrocnémien, les analyses sont en cours de réalisation.

L'étude comparative de l'expression protéique de BDNF révèle une différence significative de l'expression entre les groupes SED, EX12 et EX18 des muscles soléaires comparés aux muscles gastrocnémiens (Figure 24). En effet, le BDNF est significativement plus exprimé dans le muscle soléaire comparé au muscle gastrocnémien. Les données ELISA (Figure 24) confirment les résultats obtenus par WB qui sont représentés dans le tableau 3. A l'inverse, les taux de FNDC5 semblent être en proportion plus importante dans le muscle gastrocnémien comparé au muscle soléaire. Toutefois, seule une différence significative a été obtenue lorsque les muscles soléaires et gastrocnémiens de rats SED ont été comparés (Tableau 3).

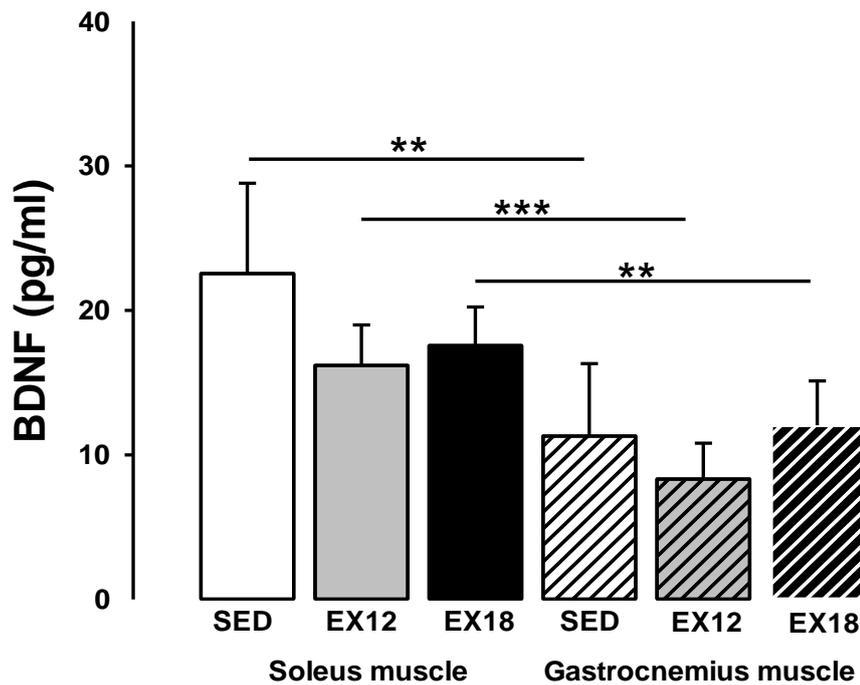


Figure 24 : Caractérisation de l'expression musculaire du BDNF dans les muscles soléaire et gastrocnémien par ELISA.

Absence d'effet de l'EX sur les taux protéiques de BDNF dans les muscles soléaires et gastrocnémiens. Diminution significative des taux musculaires de BDNF dans le muscle gastrocnémien comparé au muscle soléaire. Résultats exprimés en moyenne  $\pm$  écart-type, les concentrations en BDNF sont exprimées en pg/ml. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  comparé au muscle soléaire,  $n = 6$ /groupe, concentration en BDNF exprimée en pg/ml, moyenne  $\pm$  écartype.

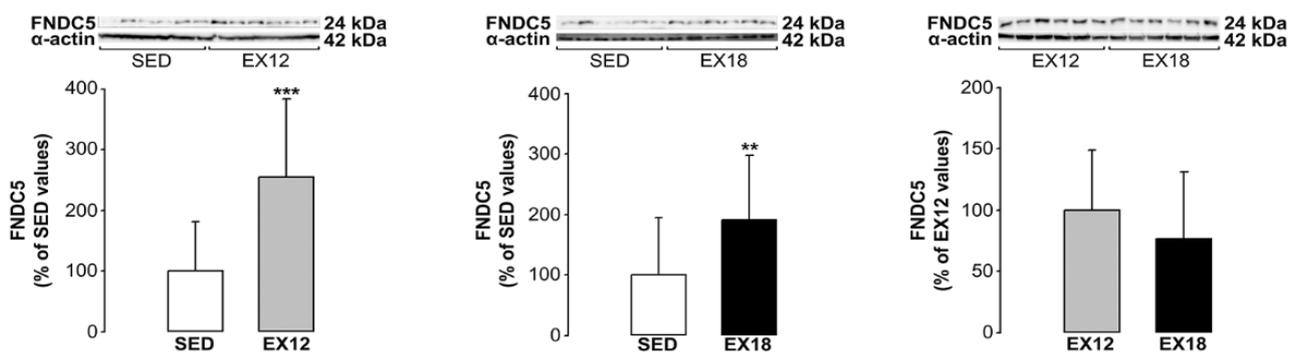


Figure 25 : Effet de l'intensité de l'EX sur l'expression protéique de FNDC5 dans le muscle soléaire.

Une augmentation significative de FNDC5 est observée pour les groupes EX12 et EX18 comparés aux SED. Aucune différence significative n'a été obtenue entre les groupes EX12 et EX18. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ,  $n = 6$ /groupe, valeurs exprimées en % des valeurs de SED  $\pm$  écartype.

Tableau 3 : Comparaison des taux protéiques de BDNF et FNDC5 entre les muscles soléaires et gastrocnémiens par analyse de WB.

| Groupes | Comparaisons     | BDNF (U.A.)   | FNDC5 (U.A.)  |
|---------|------------------|---------------|---------------|
| SED     | m. soléaire      | 1.4 ± 0.59    | 0.71 ± 0.48   |
|         | m. gastrocnémien | 0.51 ± 0.41** | 3.52 ± 0.6*** |
| EX12    | m. soléaire      | 0.96 ± 0.24   | 1.43 ± 0.61   |
|         | m. gastrocnémien | 0.28 ± 0.08** | 1.68 ± 0.61   |
| EX18    | m. soléaire      | 0.78 ± 0.22   | 1.27 ± 0.94   |
|         | m. gastrocnémien | 0.14 ± 0.07** | 1.92 ± 0.0.63 |

Les taux protéiques de BDNF sont significativement plus importants dans le muscle soléaire comparé au muscle gastrocnémien de l'ensemble des groupes. Pas de différence significative entre les taux de FNDC5 dans le muscle soléaire comparé au muscle gastrocnémien, excepté chez les rats SED.

\*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 comparé aux muscles soléaires, n = 6/groupe, valeurs exprimées en U.A. = unités arbitraires, moyenne ± écartype.

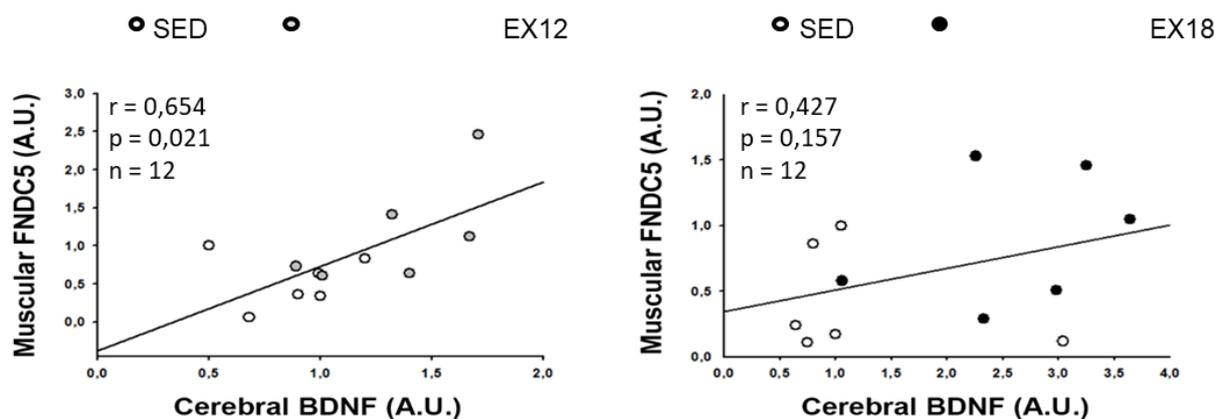


Figure 26 : Corrélations entre les expressions protéiques de BDNF cérébral (hippocampe) et FNDC5 musculaire (muscle soléaire) pour les groupes EX12 et EX18.

Enfin, comme il a été récemment montré que l'irisine est un modulateur potentiel de la synthèse cérébrale de BDNF en réponse à l'EX (Partie 1C), nous nous sommes intéressés à la connexion potentielle entre les taux musculaires de son précurseur, le FNDC5 et les taux cérébraux de BDNF après EX. Deux corrélations positives ont été mises en évidence mais une seule présentant un seuil de significativité inférieur à 0.05 a été observée, lorsque les animaux SED et EX12 étaient comparés ensemble (Figure 26).

## e. Discussion

Les principaux résultats de cette étude montrent que 1) l'EX n'impacte pas l'expression de BDNF dans les muscles soléaires et gastrocnémiens, 2) l'expression de FNDC5 ne dépend pas de l'intensité de l'EX dans le muscle soléaire, 3) une plus grande proportion de BDNF est retrouvée dans le muscle soléaire que dans le muscle gastrocnémien, 4) à l'inverse, en condition de sédentarité, le muscle gastrocnémien semble présenter des taux de FNDC5 plus importants que le muscle soléaire.

L'absence d'effet de l'EX sur l'expression de BDNF dans les muscles soléaires et gastrocnémiens s'accorde avec certaines données de la littérature (Gomez-Pinilla *et al.* 2001). Cependant, une augmentation de l'expression musculaire de BDNF avait été constatée dans plusieurs publications (Gomez-Pinilla *et al.* 2002; Cuppini *et al.* 2007; Ogborn *et al.* 2010; Lee *et al.* 2017; Yu *et al.* 2017). Cette disparité peut s'expliquer par un protocole d'EX différent, notamment au niveau de la durée et de l'intensité des efforts fournis. Il est possible qu'au bout de 7 jours, l'augmentation des taux protéiques de BDNF ne soit plus observée, comme en témoigne l'étude d'Ogborn *et al.* (2010) démontrant l'effet d'un EX de 5 jours mais pas de 10 jours. Par la suite, il semble donc nécessaire d'étudier la cinétique de l'expression musculaire de BDNF afin de vérifier cette hypothèse. Une quantification des ARNm BDNF pourrait également être utile pour interpréter nos résultats. Enfin, une forte variabilité interindividuelle de l'expression musculaire de BDNF a été constatée chez les rats soumis à l'EX (EX12, EX18) (données non présentées). Cette observation supporte l'hypothèse d'une cinétique d'expression musculaire de BDNF différente mais aussi l'implication potentielle des exosomes, dans le relargage post-EX du BDNF musculaire (Safdar *et al.* 2016). Dans ce contexte, après réalisation du protocole d'EX, un dosage circulant des exosomes ainsi qu'un marquage *in situ* avec un marqueur spécifique des exosomes (marqueur Alix) dans le muscle apparaît nécessaire pour lever cette ambiguïté.

Les résultats obtenus dans le muscle soléaire montrent que l'EX augmente les taux musculaires de FNDC5, confirmant ainsi les données de la littérature (Wrann 2015). Néanmoins, aucun effet de l'intensité de l'EX n'a été observé, s'opposant ainsi à une étude mettant en évidence un effet de l'intensité de l'EX sur les taux circulants d'irisine (Tsuchiya *et al.* 2014). L'analyse de l'expression de l'irisine musculaire et circulante semble donc essentielle pour compléter nos données.

La comparaison des muscles soléaires et gastrocnémiens a révélé à la fois une expression du BDNF plus marquée dans le muscle riche en fibres lentes (soléaire) et une expression du FNDC5 plus marquée dans le muscle riche en fibres rapides (gastrocnémien) chez les rats SED. Les données portant sur le BDNF sont en accord avec celles d'Ogborn *et al.* (2010), démontrant une expression des ARNm BDNF en plus grande proportion dans le muscle soléaire que gastrocnémien. Cette différence d'expression entre les types de muscles pourrait s'expliquer par une expression spécifique du BDNF par un type de fibre musculaire donné (lente vs rapide), mais également par les autres types cellulaires présents au sein du muscle. Comme évoqué dans la partie 1 du manuscrit, les CE des vaisseaux et les cellules satellites sont capables d'exprimer du BDNF. Une caractérisation des types cellulaires à l'origine de l'expression du BDNF au sein du muscle apparaît primordiale pour interpréter les données. Concernant le FNDC5, nos données s'opposent aux données de la littérature, montrant une expression plus marquée de FNDC5 dans le muscle gastrocnémien que soléaire, tout du moins chez les animaux SED. En effet, le FNDC5 semble être plus exprimé dans les muscles à métabolisme oxydatif que glycolytique (Wrann *et al.* 2013; Wrann 2015). De plus, comme il a été mentionné dans la partie 1C « myokines », l'expression de FNDC5 est sous le contrôle de PGC-1 $\alpha$ , dont sa fonction est principalement établie dans les muscles oxydatifs que glycolytiques (Tiraby *et al.* 2005).

Le dernier point de cette étude concerne le lien entre le FNDC5 d'origine musculaire et le BDNF d'origine cérébral. Les résultats de la figure 26 suggèrent que l'irisine d'origine musculaire ne serait pas à l'origine de l'effet de l'intensité de l'EX sur l'expression cérébrale de BDNF. En effet, une seule corrélation significative a été obtenue lorsque les animaux SED et EX12 ont été comparés ensemble. Toutefois, avant de pouvoir conclure sur ce point il est important de souligner que la mesure des taux de FNDC5 ne reflète pas directement la production d'irisine et la protéase à l'origine du clivage du FNDC5 reste inconnue. Ainsi, une mesure des taux circulants d'irisine devra être envisagée. Si ces taux sont dépendants de l'intensité, un mécanisme de clivage intensité dépendant du FNDC5 en irisine peut être un paramètre proposé. Enfin, il est également envisageable que le FNDC5 présent dans le cerveau soit à l'origine de l'élévation des taux cérébraux de BDNF en réponse à l'EX. Pour autant, les taux cérébraux de FNDC5 n'ont pas été investigués dans cette étude.

## 2. Caractérisation de l'expression cellulaire du BDNF dans le muscle squelettique

### a. Contexte de l'expérience

La différence des taux protéiques de BDNF entre le muscle soléaire et le muscle gastrocnémien nous a amené à nous interroger sur le ou les types cellulaires à l'origine de l'expression du BDNF musculaire. La différence de proportion en fibres lentes et fibres rapides pourrait expliquer cette disparité d'expression entre les muscles, mais ce point reste à être identifié.

### b. Objectifs

Dans ce contexte, les objectifs de cette étude sont d'une part, 1) de caractériser le type de fibres musculaires exprimant le BDNF et d'autre part, 2) de définir les types cellulaires à l'origine de la différence d'expression tissulaire de BDNF entre les muscles soléaires et gastrocnémiens.

### c. Matériels et méthodes

Les expériences ont été menées sur des rats mâles adultes de la souche WISTAR, sédentaires. Les animaux ont reçu un analgésique, la buprénorphine (0.05 mg/kg) en injection sous-cutanée, puis un mélange d'anesthésiques, le mélange Kétamine-Xylazine (75 mg/kg et 8 mg/kg) par voie intra-péritonéale. Une perfusion transcardiaque a ensuite été réalisée pour retirer le sang de la musculature. Les muscles soléaires et gastrocnémiens ont été prélevés et mis directement dans 4% de PFA (Paraformaldéhyde) pendant 48h, inclus en paraffine, coupés au microtome (section de 10 µm d'épaisseur) et étalés sur lame Superfrost<sup>+</sup> par la plateforme Cellimap. Brièvement, après déparaffinage, les coupes ont été perméabilisées au bain marie durant 20 min à 95°C avec un tampon citrate pH 6 (tampon de démasquage) pour démasquer les sites de fixation des anticorps. Après lavage dans une solution de Tris Buffer Saline Tween (TBST), les coupes ont été incubées 30 min dans du TBST contenant 3% de Goat serum (GS) pour bloquer les sites non spécifiques. Les lames ont ensuite été mises en contact avec une solution de TBST contenant 1% de GS et les anticorps I<sup>r</sup> décrits dans le tableau 4, toute la nuit à 4°C. Le lendemain, les coupes ont été lavées avec du TBST et incubées 60 min à l'abri de la lumière avec une solution de TBST contenant 1% de GS et les anticorps II<sup>r</sup> couplés à un fluorochrome (Tableau 4). Après une série de lavage, les coupes ont été montées entre lames

et lamelles avec un liquide de montage contenant du DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole), un marqueur spécifique des noyaux cellulaires. Les lames ont été observées au microscope à fluorescence (Axioscop 40FL, Carl Zeiss). Pour apprécier la localisation cellulaire du BDNF dans le muscle, des co-marquages ont été réalisés à l'aide d'anticorps dirigés spécifiquement contre les types cellulaires présents dans le muscle et le BDNF. Les marqueurs cellulaires utilisés sont résumés dans le tableau 4.

**Tableau 4 : Liste des anticorps primaires et secondaires utilisés lors de la technique d'immunofluorescence.**

| Protéine cible | Cellule cible              | Anticorps primaire (I')  | Anticorps secondaire (II')  |
|----------------|----------------------------|--|---|
| BDNF           | Aucune                     | Anti-BDNF (1/200, rabbit, monoclonal, ab108319, Abcam)               | Alexa Fluor 568 (1/1000, anti-Rabbit, polyclonal, A11036, Invitrogen) |
| MyHC I         | Fibres musculaires lentes  | Anti-Slow Skeletal Myosin (1/200, mouse, monoclonal ab11083, Abcam)  | Alexa Fluor 488 (1/1000, anti-Mouse, polyclonal, A11029, Invitrogen)  |
| MyHC II        | Fibres musculaires rapides | Anti-Fast Skeletal Myosin (1/300, mouse, Monoclonal, ab51263, Abcam) |   |
| vWF            | Cellules endothéliales     | Anti-vWF (1/100, mouse, monoclonal, 142828, USBiological)            |   |
| Pax-7          | Cellules satellites        | Anti-Pax 7 (1/100 et 1/200 mouse, monoclonal, ab199010, Abcam)       |   |

#### d. Résultats

Des doubles marquages BDNF / fibres lentes (MyHC I) et BDNF / fibres rapides (MyHC II) ont été réalisés pour les muscles soléaires et gastrocnémiens et sont présentés dans les figures 27 et 28. De façon surprenante, les résultats montrent que le BDNF est très largement exprimé dans les fibres rapides comparativement aux fibres lentes. En effet, la superposition des images représentant le BDNF et le marquage MyHC II confirment que les fibres rapides expriment le BDNF (marquage jaune) mais pas les fibres lentes (Figures 27 et 28). Très récemment, nous avons également mis en évidence un co-marquage BDNF et le marqueur spécifique des CE (vWF) au niveau de l'endothélium des vaisseaux présents au sein des muscles

(données non présentées). Pour l'expression des autres types cellulaires, les expériences sont en cours de réalisation.

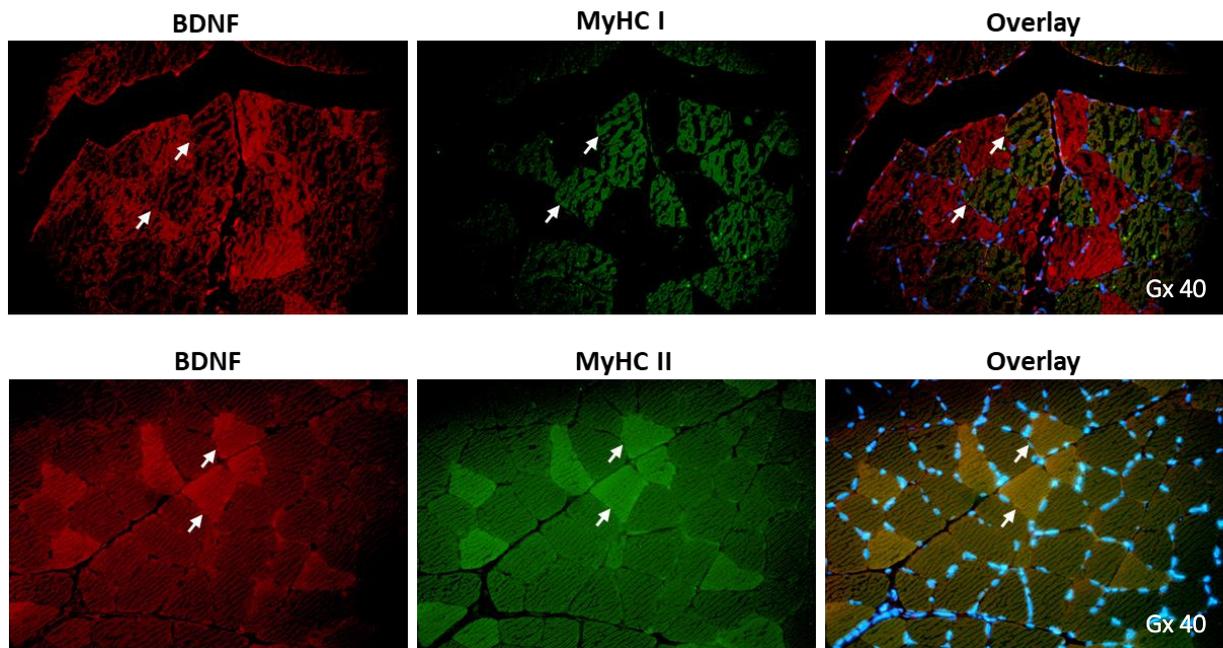


Figure 27: Représentation des co-marquages BDNF / fibres lentes (MyHC I) et BDNF / fibres rapides (MyHC II) dans le muscle soléaire.

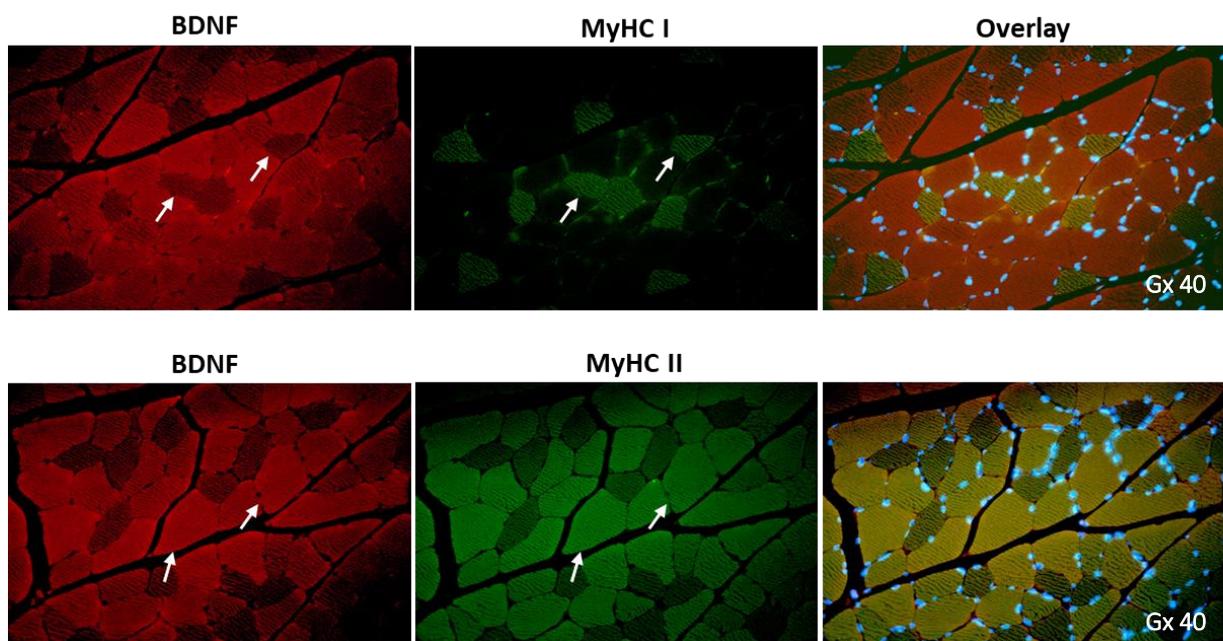


Figure 28 : Représentation des co-marquages BDNF / fibres lentes (MyHC I) et BDNF / fibres rapides (MyHC II) dans le muscle gastrocnémien.

### e. Discussion

Nos résultats préliminaires mettent en évidence que la différence tissulaire d'expression du BDNF n'est pas à relier au type de fibres musculaires. En effet, d'après notre analyse par immunofluorescence, les fibres lentes ne sont peu ou pas à l'origine de l'expression du BDNF dans le muscle soléaire. Nos données montrent que le BDNF est très exprimé par les fibres rapides des muscles soléaires et gastrocnémiens (Figures 27 et 28). Ces résultats s'accordent avec des travaux récents montrant que le BDNF est un médiateur des fibres glycolytiques, justifiant ainsi son expression plus marquée au niveau des fibres de type II (Delezie *et al.* 2019). Néanmoins la proportion faible de fibres rapides dans le muscle soléaire ne peut expliquer les taux tissulaires de BDNF plus importants (Figure 24 et Tableau 3). Bien que l'étude soit encore au stade préliminaire, nos données et la littérature supportent l'idée que les autres types cellulaires tels que les CE et/ou les cellules satellites puissent être des sources importantes de BDNF musculaire. En effet, les muscles oxydatifs présenteraient une vascularisation et une proportion en cellules satellites plus importantes que les muscles glycolytiques (Schiaffino *et al.* 2011; Yin *et al.* 2013). Comme mentionné auparavant, les cellules satellites sont des sources importantes de BDNF dans le muscle (Mousavi *et al.* 2006). Néanmoins, l'utilisation de l'anticorps dirigé contre le marqueur spécifique des cellules satellites nécessite une mise au point plus approfondie. En conclusion, une quantification de la proportion en CE et en cellules satellites apparaît primordiale pour compléter et interpréter les données obtenues par analyse d'immunofluorescence.

*Partie 3 – Discussion  
générale et perspectives*

Nos travaux portant sur l'impact des modalités de l'EX sur la voie de signalisation du BDNF i) montrent une localisation préférentielle du BDNF au niveau de l'endothélium des vaisseaux périphériques (artère et veine) et une surexpression comparable dans l'endothélium des deux vaisseaux en réponse à l'EX, ii) révèlent une augmentation du BDNF d'origine cérébral (hippocampe, cortex préfrontal et sensorimoteur) dépendante de l'intensité de l'EX, iii) ne soulignent pas de différence d'expression du BDNF cérébral entre un EX concentrique et un EX excentrique à sollicitation cardiovasculaire identique, iv) démontrent l'absence d'effet de notre protocole d'EX sur la production musculaire de BDNF.

### 1. Etude 1 – Le BDNF d'origine vasculaire

Il est maintenant bien admis que le BDNF est synthétisé à la fois par les vaisseaux périphériques et cérébraux. Les principaux résultats obtenus *in vivo* sont issus du laboratoire et montrent une expression du BDNF par les artères périphériques et/ou cérébrales ainsi que par les microvaisseaux cérébraux (Quirie *et al.* 2012; Prigent-Tessier *et al.* 2013; Monnier, Garnier, *et al.* 2017; Monnier, Prigent-Tessier, *et al.* 2017; Pedard *et al.* 2018; Totoson *et al.* 2018). Toutefois, l'expression du BDNF dans les veines n'a pas été reportée *in vivo* jusqu'à présent. Nos travaux issus de l'étude 1 sont les premiers à étudier *in vivo*, l'expression du BDNF dans la veine cave inférieure et à comparer cette dernière avec celle de l'aorte abdominale (vaisseau de même territoire vasculaire). Nos résultats montrent, en condition basale, que l'aorte abdominale exprime plus de BDNF que la veine cave inférieure. Nos études d'immunofluorescence identifient l'endothélium comme la source principale de BDNF dans les deux vaisseaux comparés à la média. La différence d'expression entre l'aorte et la veine peut s'expliquer par la différence de SS appliqué sur l'endothélium de l'artère et la veine. En effet, l'aorte, avec un diamètre interne plus petit que celui de la veine, présente un SS plus important. Il est également possible que cette différence soit liée à la proportion de CMLV, la média de l'aorte étant plus épaisse que celle de la veine. Par la suite, il serait intéressant de comparer des vaisseaux de résistance et de conductance afin d'évaluer si la caractéristique fonctionnelle du vaisseau influence l'expression du BDNF.

Dans cette étude nous avons également augmenté le SS en réponse à l'EX en utilisant un modèle d'EX réalisé en routine au laboratoire. Ce protocole d'EX imposé (18 m/min pendant 30 min/jour, 7 jours consécutifs) augmente significativement les taux de BDNF dans les artères périphériques et les microvaisseaux cérébraux (Quirie *et al.* 2012; Prigent-Tessier *et al.* 2013; Monnier, Garnier, *et al.* 2017). Au niveau périphérique, la comparaison de la réponse de l'artère et la veine à l'EX montre que les deux vaisseaux répondent de façon similaire en surexprimant à la fois le BDNF, les p-TrkB<sup>Tyr816</sup> et la eNOS. De façon étonnante, aucune corrélation n'a été obtenue entre les expressions de BDNF et de p-eNOS<sup>Ser1177</sup> en condition d'EX, quel que soit le vaisseau étudié alors qu'au niveau des fractions enrichies en microvaisseaux cérébraux, le laboratoire a mis en évidence une corrélation positive entre ces deux paramètres (Monnier 2017). Ce résultat peut d'une part, s'expliquer par la méthode d'évaluation de la production endothéliale de NO adoptée. En effet, le dosage par WB des protéines eNOS phosphorylée (p-eNOS<sup>Ser1177</sup>) et non phosphorylée, renseigne exclusivement les taux protéiques des enzymes productrices de NO. Or, la production de NO dépend de l'activité des enzymes de synthèse mais également de la disponibilité de l'arginine (substrat) et de l'activité des arginases qui sont en compétition avec la eNOS. Pour la suite de cette étude, il serait ainsi important d'évaluer le lien NO-BDNF vasculaire en conditions basale et stimulée, en mesurant la production de NO par des techniques directes comme le dosage nitrite/nitrate ou l'utilisation d'une sonde de diamino fluorescéine-2 diacétate (DAF-2DA).

D'autre part, une autre explication est que la surexpression de BDNF vasculaire en réponse à l'EX ne dépendrait pas exclusivement de la production endothéliale de NO. L'exposition de l'aorte et la veine à du GTN (donneur de NO) avant et après EX aurait permis d'obtenir des arguments supplémentaires en faveur ou non de cette hypothèse. On sait en effet, que l'EX augmente les taux circulants d'autres facteurs tels que le facteur tissulaire du plasminogène (t-PA) et l'irisine. Le lien entre le t-PA et le BDNF a été mis en évidence il y a maintenant plus d'une décennie, en montrant que le système t-PA/plasmine permet de cliver le proBDNF en BDNF. De plus, au laboratoire, il a été démontré que le t-PA module la production cérébrale de BDNF via l'activation des récepteurs NMDA (Rodier *et al.* 2014). Toutefois, ces résultats concernent la production cérébrale de BDNF et n'apportent aucune preuve d'un lien entre t-PA et production endothéliale de BDNF. Il serait donc important de déterminer dans quelle mesure cette molécule est impliquée dans la surproduction endothéliale de BDNF en réponse à l'EX. L'autre possibilité, bien qu'hypothétique pourrait être l'impact de l'irisine sur la surproduction

endothéliale de BDNF en réponse à l'EX. Néanmoins, les résultats disponibles ne concernent que le BDNF d'origine cérébral, la littérature ne fournissant pas de données sur l'impact de cette myokine sur le métabolisme endothélial du BDNF.

Même s'il apparaît maintenant clairement que l'endothélium représente une source importante de BDNF, à la fois à la périphérie et au niveau cérébral, le rôle de celui-ci n'est pas clairement identifié. Des travaux montrent que le BDNF endothélial joue un rôle vasodilatateur et angiogénique mais son rôle dans la neuroplasticité n'a pas été démontré *in vivo*. A cet égard, le laboratoire a récemment obtenu un financement pour créer une souris KO conditionnel n'exprimant pas de BDNF dans l'endothélium. La caractérisation du phénotype de cette souris permettra ainsi d'identifier le rôle neuroplastique du BDNF endothélial.

## **2. Etudes 2 et 3 - Impact des modalités de l'EX**

### **a. Considération méthodologique du protocole d'EX**

Dans la littérature, aucun consensus concernant les protocoles d'EX n'est disponible. Ainsi, chaque auteur a recours à l'intensité, la durée et la fréquence de son choix. Il en est de même pour l'intensité, qui est subjective lorsqu'il s'agit de définir une intensité d'EX dite légère, modérée et intense. Le mode de constitution des groupes est également varié, puisqu'il peut être réalisé de façon aléatoire ou à partir de données telles que la VMA, la lactatémie ou la corticostéronémie. La lactatémie est un indice physiologique important pour évaluer l'impact de l'intensité de l'effort sur la fatigue musculaire engendrée par l'accumulation d'acide lactique dans le sang. Il en est de même pour la corticostéronémie permettant d'évaluer la réponse au stress engendrée par un EX intense.

Au laboratoire, notre choix s'est porté sur la VMA pour constituer nos groupes d'EX pour les études 2 et 3, étudiant respectivement l'impact de l'intensité de l'EX et des modalités de contraction. Ce type de randomisation semble limiter la variabilité interindividuelle et augmenter la puissance statistique des résultats, comparé à la randomisation aléatoire. Les paramètres précédemment cités auraient pu être également mesurés, à savoir la lactatémie et la corticostéronémie. Dans nos conditions expérimentales, le stress induit par la course à allure soutenue, ou en pente ascendante/descendante, n'a pas eu d'impact sur la production

cérébrale de BDNF dans le cortex mais également dans l'hippocampe, structure connue pour être riche en récepteurs aux glucocorticoïdes. En amont des protocoles d'EX, les animaux ont été familiarisés pendant 5 jours aux expérimentateurs et au tapis roulant afin de limiter leur stress. Même si nos données suggèrent que le stress engendré par la course est négligeable, il serait utile à l'avenir de prendre en compte ces paramètres dans le développement de futurs protocoles d'EX.

Enfin, le dernier point à discuter concerne la différence de charge de travail fournie par les groupes EX12 et EX18 lors d'un EX quotidien de 30 min pendant 7 jours. Ne souhaitant faire varier que l'intensité de l'effort, une charge de travail plus conséquente a été initiée par le groupe EX18 comparé au groupe EX12. Il est donc fort probable que la fatigue musculaire soit plus importante chez les rats EX18. Au niveau des paramètres physiologiques, une différence potentielle de masse musculaire et de poids total entre les groupes aurait pu être attendue, cependant d'après nos données ces paramètres ne varient pas entre les groupes EX12, EX18 et SED.

#### **b. Impact des modalités de l'EX sur le BDNF cérébral**

Nos résultats de l'étude 2 démontrent au niveau cérébral que l'activation de la voie de signalisation du BDNF dépend de l'intensité de l'EX. Un effet graduel a même été remarqué dans l'hippocampe, structure la plus riche en BDNF et jouant un rôle clé dans la cognition. Nous avons également observé que globalement, les marqueurs de la neuroplasticité (SYN), du flux sanguin cérébral (p-eNOS<sup>Ser1177</sup>) et de l'activité neuronale (c-fos) augmentent en fonction de l'intensité dans le cortex et l'hippocampe. Nos travaux confortent les données obtenues chez l'Homme rapportant un effet plus marqué de l'EX sur les processus cognitifs lorsque celui-ci est pratiqué à une intensité soutenue (Cabral-Santos *et al.* 2016; Etnier *et al.* 2016), alors que les études décrites chez l'animal concluent essentiellement à un effet positif de l'EX lorsque ce dernier est pratiqué à une intensité légère voir modérée (Soya *et al.* 2007; Lou *et al.* 2008; Shih *et al.* 2013). Pris ensemble, ces données suggèrent que le paramètre intensité doit être pris en compte lors de la pratique de l'EX pour améliorer la santé cérébrale.

Dans ce contexte, l'entraînement fractionné de haute intensité (HIIT) s'opposant à la pratique continue d'un EX pourrait être une stratégie permettant d'exploiter le paramètre intensité tout en adaptant la durée de l'effort. En effet, le HIIT est pratiqué en fractionné avec des périodes d'effort courtes et intenses alternées de périodes de récupération. Ce type d'EX

est de plus en plus utilisé chez l'homme pour ses bénéfices cardiovasculaires et métaboliques reconnus et la capacité à l'adapter en fonction de la population concernée. Les travaux sur son impact cérébral commencent depuis quelques années à se multiplier comme en témoigne la revue de Jimenez-Maldonado *et al.* (2018). Chez l'animal, le HIIT semble plus efficace pour augmenter les taux cérébraux de BDNF comparé à un EX continu (Afzalpour *et al.* 2015; TaheriChadorneshin *et al.* 2017; Freitas *et al.* 2018). Chez l'homme une augmentation des taux circulants de BDNF a également été constatée que ce soit après une session ou plusieurs sessions d'HIIT (Cabral-Santos *et al.* 2016; Jimenez-Maldonado *et al.* 2018; Slusher *et al.* 2018). Même s'il apparaît clair que l'HIIT impacte positivement les taux cérébraux de BDNF, il est moins clair lorsqu'il s'agit de ces effets fonctionnels au niveau cérébral. En effet, seule une amélioration des comportements anxieux et dépressifs a été constatée chez l'animal (TaheriChadorneshin *et al.* 2017).

#### **c. BDNF d'origine cérébral**

Nos résultats des études 2 et 3 démontrent que l'EX, qu'il soit d'intensité soutenue, modérée, réalisé en excentrique ou concentrique, augmente les taux protéiques de BDNF dans l'hippocampe et le cortex (préfrontal, sensorimoteur). Ces augmentations s'accompagnent d'une augmentation des expressions des marqueurs de l'activité neuronale (c-fos) et du flux sanguin cérébral (p-eNOS<sup>Ser1177</sup>). Néanmoins, l'évaluation de la contribution endothéliale et neuronale dans la surproduction de BDNF par le cortex et l'hippocampe en réponse à l'EX n'a pas été évaluée directement. Des résultats préliminaires réalisés sur des coupes cérébrales de rats EX12 et EX18 ont montré une expression importante de BDNF par l'endothélium des vaisseaux de petits et gros calibres (résultats non présentés). Récemment, la désendothélialisation cérébrale par le CHAPS a montré une chute drastique des taux cérébraux de BDNF chez le rat SED (Monnier, Prigent-Tessier, *et al.* 2017). Dans la continuité de ces travaux, l'utilisation de la technique CHAPS en condition d'EX est un prérequis indispensable pour évaluer la part de l'endothélium cérébral dans la surproduction cérébrale de BDNF en réponse à l'EX.

#### **d. Effet de l'intensité de l'EX sur la mémoire**

Au laboratoire, l'impact de l'intensité de l'EX sur la mémoire a été investiguée par le test de reconnaissance d'objet. Dans nos conditions expérimentales, les capacités cognitives des

animaux n'ont pas été améliorées par le protocole d'EX quelle que soit l'intensité utilisée en condition physiologique. En revanche, dans des conditions d'altération de la mémoire, par l'utilisation de la scopolamine, nos travaux montrent que les animaux soumis à un EX de forte intensité ont passé significativement plus de temps sur le nouvel objet que l'objet familier. Ce résultat démontre ainsi un effet positif de l'EX de haute intensité comparé à l'EX modéré mais s'oppose aux travaux de Shih *et al.* (2013) montrant un effet positif de l'EX seulement lorsqu'il est pratiqué à intensité légère (8 m/min), dans des conditions d'ischémie cérébrale. L'insuffisance et la divergence des données témoignent d'une nécessité de travaux plus approfondis dans la compréhension de l'effet dual de l'intensité de l'EX sur les fonctions cognitives.

L'absence d'effet de notre protocole d'EX en condition normale (absence de scopolamine) peut s'expliquer par différents points. Tout d'abord, il est possible que la durée du protocole ne soit pas suffisante (7 jours) pour obtenir un effet. Ensuite, la phase d'apprentissage des deux objets identiques n'est sans doute pas suffisante. La répétition de la phase de training (2 objets identiques) aurait pu être envisagée avant d'utiliser la scopolamine. Il est également possible que le NORT ne soit pas adapté à nos conditions et que la mise en place d'un test plus sensible, présentant un apprentissage plus conséquent soit indispensable pour la poursuite des études au laboratoire, comme le test de la piscine de Morris. Enfin, la mémoire aurait également pu être étudiée par la mesure de la LTP.

Finalement, nos données expérimentales suggèrent que le cortex préfrontal est possiblement la structure la plus pertinente comparée à l'hippocampe, lorsque les marqueurs neuroplastiques tels que le BDNF, sont utilisés comme le reflet de l'amélioration des performances mnésiques. Dans nos conditions, l'EX de forte intensité a conduit à une augmentation significative de l'expression corticale de BDNF et une amélioration de la mémoire comparativement à l'EX modéré.

#### **e. Retombées cliniques**

Ces travaux de thèse ont révélé qu'un EX soutenu (70% de la VMA) augmente significativement l'activation de la voie du BDNF et améliore la mémoire de reconnaissance après une amnésie transitoire provoquée chez le rongeur. Ces résultats même si encourageants, excluent pourtant une partie importante de la population humaine. En effet, pratiquer un EX à haute intensité n'est pas possible pour tous. Ce type d'EX s'adresse

principalement à une population jeune, active et/ou en bonne santé. Dans ce contexte, au laboratoire, nous envisageons une nouvelle approche utilisant l'électromyostimulation, pour proposer une alternative adaptée pour tous afin de bénéficier des effets procognitifs sans pour autant le pratiquer en condition aérobie. En effet, l'électromyostimulation ne nécessite pas de mouvements physiques complets, seulement l'utilisation d'électrodes stratégiquement placées sur le muscle. Depuis ces 5 dernières années, la littérature commence à être de plus en plus documentée sur ce sujet. Chez l'Homme, la stimulation neuromusculaire augmente les taux sériques (Kimura *et al.* 2019) et plasmatiques (Miyamoto *et al.* 2018) de BDNF. Chez l'animal, les taux hippocampiques de BDNF sont régulés à la hausse en réponse à l'électromyostimulation (Dalise *et al.* 2017; Maekawa *et al.* 2018). Néanmoins, les effets de l'électromyostimulation sur les fonctions cognitives sont peu documentés. Le laboratoire prévoit ainsi de comparer un EX aérobie et un EX d'électromyostimulation afin d'identifier les changements neuroplastiques et fonctionnels générés. Les paramètres de durée, de fréquence et d'intensité seront déterminés afin d'obtenir une étude complète sur les effets cérébraux de l'électromyostimulation.

### 3. Etude 4 - Le BDNF musculaire

Les travaux préliminaires de l'étude 4 montrent que l'EX qu'il soit d'intensité modérée ou soutenue n'impacte pas les taux musculaires de BDNF. Ces résultats sont en accord avec certains auteurs (Gomez-Pinilla *et al.* 2001) et en contradiction avec d'autres (Cuppini *et al.* 2007; Ogborn *et al.* 2010; Lee *et al.* 2017). L'absence d'effet peut être liée au protocole d'EX non adapté ou à un temps de sacrifice ne permettant pas d'observer des changements d'expressions de la protéine BDNF dans le muscle. La quantification de l'expression des ARNm BDNF et une cinétique de l'expression musculaire de BDNF permettraient ainsi de compléter les données actuelles. Une dernière hypothèse serait que l'EX induise une libération massive du BDNF musculaire via des exosomes, justifiant ainsi des taux protéiques de BDNF inchangés après EX et une forte variabilité interindividuelle dans l'expression du BDNF musculaire (résultats non présentés). Pour vérifier cette théorie, le laboratoire envisage de réaliser une étude d'immunofluorescence afin de marquer le BDNF musculaire et les exosomes formés au sein du muscle et s'accumulant à la membrane des rhabdomyocytes.

En accord avec la littérature (Wrann 2015), nous avons récemment observés une augmentation de l'expression musculaire de FNDC5 induite par l'EX, pratiqué à la fois à allure modérée et soutenue. Cependant, aucun effet de l'intensité de l'EX n'a été obtenu, alors que chez l'Homme, un effet de l'intensité de l'EX sur les taux circulants de l'irisine avait été rapporté (Tsuchiya *et al.* 2014). Il n'est pas impossible que l'effet de l'intensité de l'EX se caractérise non pas par une synthèse *de novo* mais plutôt par un clivage post-traductionnel de FNDC5. Néanmoins, la protéase à l'origine du clivage de FNDC5 en irisine reste inconnue, empêchant ainsi d'évaluer son activité enzymatique. Par conséquent, la mesure des taux circulants d'irisine pourrait lever cette ambiguïté.

Afin d'observer le lien entre le BDNF cérébral et l'irisine musculaire, nous avons réalisé des corrélations entre les expressions hippocampiques de BDNF et les expressions musculaires de FNDC5. Nos résultats montrent une corrélation significative uniquement lorsque les animaux SED et EX12 sont comparés, suggérant que l'effet de l'intensité de l'EX sur les taux cérébraux de BDNF ne sont pas en lien direct avec la production de FNDC5 musculaire. Cette interprétation doit être prise avec prudence étant donné que seul le FNDC5 musculaire a été quantifié, ne renseignant pas à 100% de la production de l'irisine. Il est en effet possible que l'irisine hippocampique et/ou musculaire soit à l'origine des effets de l'intensité de l'EX sur les taux cérébraux de BDNF, pour autant les taux hippocampiques n'ont pas encore été quantifiés.

**En conclusion, nos résultats :**

- 1) apportent des arguments forts en faveur d'un rôle clé du BDNF d'origine endothélial dans les bienfaits cardiovasculaires de l'EX
- 2) fournissent des preuves de l'importance de définir les modalités de l'EX en vue d'améliorer les performances cognitives
- 3) suggèrent l'importance de cibler l'endothélium et le muscle dans la compréhension des effets neuroplastiques de l'EX

L'ensemble de ces données ouvre de nouvelles perspectives dans la compréhension du lien existant entre EX et santé cérébrale.

## Publications et communications

### Publications

Pedard M., Cefis M., Ennequin G., Quirié A., Garnier P., Prigent-Tessier A., Pernet N., Marie C., (2018). Brain-derived Neurotrophic Factor Pathway after Downhill and Uphill Training in Rats. *Medicine Science and Sports Exercise*.

Cefis M., Prigent-Tessier A., Quirié A., Pernet N., Marie C., Garnier P., (2019). The effect of exercise on memory and BDNF signaling is dependent on intensity. *Brain structure and function*.

Cefis M., Quirié A., Pernet N., Marie C., Garnier P., Prigent-Tessier A., (2019). Uniform response of arterial and venous brain-derived neurotrophic factor to treadmill exercise in male rats. Soumise dans *J of applied Physiology*.

### Communications affichées

Cefis M., Merignac-Lacombe J, Quirie A., Marie C., Garnier P., Prigent-Tessier A. Impact de l'intensité de l'exercice physique sur les taux cérébraux et musculaires de BDNF : Rôle de l'irisine ?  
Congrès international ACAPS (Association des chercheurs en activités physiques et sportives), Paris, France, Octobre 2019.

Cefis M., Quirie A., Marie C., Tessier A., Garnier P. Impact de l'activité physique sur l'expression du gène *bdnf* par les vaisseaux périphériques et cérébraux. Forum des jeunes chercheurs (FJC), Dijon, France, Juin 2017. 23<sup>ème</sup> forum, Session cardiologie et neurologie, P 73.

### Communications orales

Cefis M., Merignac-Lacombe J, Quirie A., Garnier P., Marie C., Tessier A. Effect of exercise intensity on cerebral and muscular brain-derived neurotrophic factor. Connection with the myokine irisin. Congrès de physiologie et Biologie intégrative, Montpellier, France, Juin 2019.

Cefis M., Quirie A., Pernet N., Marie C., Tessier A., Garnier P. L'amélioration de la mémoire dépend de l'intensité de l'exercice. Congrès national SCMC (Société cerveau et maladies cérébrovasculaires), Lille, France, Mars 2019.

Cefis M., Quirie A., Pernet N., Marie C., Tessier A., Garnier P. Impact de l'intensité de l'exercice physique sur la cognition. Forum des jeunes chercheurs (FJC), Besançon, France, Juin 2018. 24<sup>ème</sup> forum, Session Neurosciences, P 19.

Cefis M., Quirie A., Pernet N., Marie C., Tessier A., Garnier P. Neuroplasticité : impact de l'intensité de l'exercice physique ?  
Congrès national SCMC (Société cerveau et maladies cérébrovasculaires), Paris, France, Mars 2018.

Cefis M., Quirie A., Pernet N., Marie C., Tessier A., Garnier P. Effet de l'intensité de l'activité physique sur la production cérébrale de BDNF. Congrès international ACAPS (Association des chercheurs en activités physiques et sportives), Dijon, France, Octobre 2017. Movement & Sport Sciences – Science et Motricité, num 95.

Cefis M., Quirie A., Pernet N., Marie C., Tessier A., Garnier P. Vascular mRNA expression of Brain-derived neurotrophic factor. Impact of physical training. Congrès international FEPS (Federation of european physiological societies), Vienne, Autriche, Septembre 2017. Acta Physiologica vol. 221, Supp S713 (S04-5(0)).

## Références bibliographiques

- Afzalpour, M. E., H. T. Chadorneshin, M. Foadoddini, and H. A. Eivari. 2015. 'Comparing interval and continuous exercise training regimens on neurotrophic factors in rat brain', *Physiol Behav*, 147: 78-83: 10.1016/j.physbeh.2015.04.012.
- Aggarwal, N., and B. F. Sloane. 2014. 'Cathepsin B: multiple roles in cancer', *Proteomics Clin Appl*, 8: 427-37: 10.1002/prca.201300105.
- Aguiar, A. S., Jr., A. A. Castro, E. L. Moreira, V. Glaser, A. R. Santos, C. I. Tasca, A. Latini, and R. D. Prediger. 2011. 'Short bouts of mild-intensity physical exercise improve spatial learning and memory in aging rats: involvement of hippocampal plasticity via AKT, CREB and BDNF signaling', *Mech Ageing Dev*, 132: 560-7: 10.1016/j.mad.2011.09.005.
- Aguiar, A. S., Jr., A. E. Speck, R. D. Prediger, F. Kapczinski, and R. A. Pinho. 2008. 'Downhill training upregulates mice hippocampal and striatal brain-derived neurotrophic factor levels', *J Neural Transm (Vienna)*, 115: 1251-5: 10.1007/s00702-008-0071-2.
- Aguiar, A. S., Jr., T. Tuon, C. A. Pinho, L. A. Silva, A. C. Andrezza, F. Kapczinski, J. Quevedo, E. L. Streck, and R. A. Pinho. 2007. 'Mitochondrial IV complex and brain neurotrophic derived factor responses of mice brain cortex after downhill training', *Neurosci Lett*, 426: 171-4: 10.1016/j.neulet.2007.08.058.
- Aid, T., A. Kazantseva, M. Piirsoo, K. Palm, and T. Timmusk. 2007. 'Mouse and rat BDNF gene structure and expression revisited', *J Neurosci Res*, 85: 525-35: 10.1002/jnr.21139.
- Alaei, H., L. Borjeian, M. Azizi, S. Orian, A. Pourshanzari, and O. Hanninen. 2006. 'Treadmill running reverses retention deficit induced by morphine', *Eur J Pharmacol*, 536: 138-41: 10.1016/j.ejphar.2006.02.025.
- Alderson, R. F., R. Curtis, A. L. Alterman, R. M. Lindsay, and P. S. DiStefano. 2000. 'Truncated TrkB mediates the endocytosis and release of BDNF and neurotrophin-4/5 by rat astrocytes and schwann cells in vitro', *Brain Res*, 871: 210-22
- Altar, C. A., N. Cai, T. Bliven, M. Juhasz, J. M. Conner, A. L. Acheson, R. M. Lindsay, and S. J. Wiegand. 1997. 'Anterograde transport of brain-derived neurotrophic factor and its role in the brain', *Nature*, 389: 856-60: 10.1038/39885.
- Altar, C. A., and P. S. DiStefano. 1998. 'Neurotrophin trafficking by anterograde transport', *Trends Neurosci*, 21: 433-7
- Amoureux, S., L. Lorgis, P. Sicard, C. Girard, L. Rochette, and C. Vergely. 2012. 'Vascular BDNF expression and oxidative stress during aging and the development of chronic hypertension', *Fundam Clin Pharmacol*, 26: 227-34: 10.1111/j.1472-8206.2010.00912.x.
- Anderson, B. J., D. N. Rapp, D. H. Baek, D. P. McCloskey, P. S. Coburn-Litvak, and J. K. Robinson. 2000. 'Exercise influences spatial learning in the radial arm maze', *Physiol Behav*, 70: 425-9: 10.1016/s0031-9384(00)00282-1.
- Armanini, M. P., S. B. McMahon, J. Sutherland, D. L. Shelton, and H. S. Phillips. 1995. 'Truncated and catalytic isoforms of trkB are co-expressed in neurons of rat and mouse CNS', *Eur J Neurosci*, 7: 1403-9
- Aswad, H., A. Forterre, O. P. Wiklander, G. Vial, E. Danty-Berger, A. Jalabert, A. Lamaziere, E. Meugnier, S. Pesenti, C. Ott, K. Chikh, S. El-Andaloussi, H. Vidal, E. Lefai, J. Rieusset, and S. Rome. 2014. 'Exosomes participate in the alteration of muscle homeostasis during lipid-induced insulin resistance in mice', *Diabetologia*, 57: 2155-64: 10.1007/s00125-014-3337-2.

- Bai, X., C. Yilin, X. Qi, and D. Cai. 2014. 'Single-cell analysis for BDNF and TrkB receptors in cardiac microvascular endothelial cells', *Biomed Mater Eng*, 24: 2257-64: 10.3233/BME-141038.
- Banoujaafar, H., J. Van Hoecke, C. M. Mossiat, and C. Marie. 2014. 'Brain BDNF levels elevation induced by physical training is reduced after unilateral common carotid artery occlusion in rats', *J Cereb Blood Flow Metab*, 34: 1681-7: 10.1038/jcbfm.2014.133.
- Barde, Y. A., D. Edgar, and H. Thoenen. 1982. 'Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain', *EMBO J*, 1: 549-53
- Barker, P. A. 2009. 'Whither proBDNF?', *Nat Neurosci*, 12: 105-6: 10.1038/nn0209-105.
- Bartkowska, K., K. Turlejski, and R. L. Djavadian. 2010. 'Neurotrophins and their receptors in early development of the mammalian nervous system', *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 70: 454-67
- Bartoletti, A., L. Cancedda, S. W. Reid, L. Tessarollo, V. Porciatti, T. Pizzorusso, and L. Maffei. 2002. 'Heterozygous knock-out mice for brain-derived neurotrophic factor show a pathway-specific impairment of long-term potentiation but normal critical period for monocular deprivation', *J Neurosci*, 22: 10072-7
- Bayas, A., V. Hummel, B. A. Kallmann, C. Karch, K. V. Toyka, and P. Rieckmann. 2002. 'Human cerebral endothelial cells are a potential source for bioactive BDNF', *Cytokine*, 19: 55-8
- Bechara, R. G., and A. M. Kelly. 2013. 'Exercise improves object recognition memory and induces BDNF expression and cell proliferation in cognitively enriched rats', *Behav Brain Res*, 245: 96-100: 10.1016/j.bbr.2013.02.018.
- Bejot, Y., A. Prigent-Tessier, C. Cachia, M. Giroud, C. Mossiat, N. Bertrand, P. Garnier, and C. Marie. 2011. 'Time-dependent contribution of non neuronal cells to BDNF production after ischemic stroke in rats', *Neurochem Int*, 58: 102-11: 10.1016/j.neuint.2010.10.019.
- Berchtold, N. C., N. Castello, and C. W. Cotman. 2010. 'Exercise and time-dependent benefits to learning and memory', *Neuroscience*, 167: 588-97: 10.1016/j.neuroscience.2010.02.050.
- Berchtold, N. C., G. Chinn, M. Chou, J. P. Kessler, and C. W. Cotman. 2005. 'Exercise primes a molecular memory for brain-derived neurotrophic factor protein induction in the rat hippocampus', *Neuroscience*, 133: 853-61: 10.1016/j.neuroscience.2005.03.026.
- Bergami, M., R. Rimondini, S. Santi, R. Blum, M. Gotz, and M. Canossa. 2008. 'Deletion of TrkB in adult progenitors alters newborn neuron integration into hippocampal circuits and increases anxiety-like behavior', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 15570-5: 10.1073/pnas.0803702105.
- Bessis, A., C. Bechade, D. Bernard, and A. Roumier. 2007. 'Microglial control of neuronal death and synaptic properties', *Glia*, 55: 233-8: 10.1002/glia.20459.
- Bidzan-Bluma, I., and M. Lipowska. 2018. 'Physical Activity and Cognitive Functioning of Children: A Systematic Review', *Int J Environ Res Public Health*, 15: 10.3390/ijerph15040800.
- Biojone, C., P. C. Casarotto, S. R. Joca, and E. Castren. 2015. 'Interplay Between Nitric Oxide and Brain-Derived Neurotrophic Factor in Neuronal Plasticity', *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 14: 979-87
- Black, J. E., K. R. Isaacs, B. J. Anderson, A. A. Alcantara, and W. T. Greenough. 1990. 'Learning causes synaptogenesis, whereas motor activity causes angiogenesis, in cerebellar cortex of adult rats', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87: 5568-72

- Bliss, T. V., and A. R. Gardner-Medwin. 1973. 'Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path', *J Physiol*, 232: 357-74: 10.1113/jphysiol.1973.sp010274.
- Bliss, T. V., and T. Lomo. 1973. 'Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path', *J Physiol*, 232: 331-56: 10.1113/jphysiol.1973.sp010273.
- Bloor, C. M. 2005. 'Angiogenesis during exercise and training', *Angiogenesis*, 8: 263-71: 10.1007/s10456-005-9013-x.
- Bordy, R., A. Quirie, C. Marie, D. Wendling, P. Totoson, and C. Demougeot. 2019. 'Vascular Arginase Is a Relevant Target to Improve Cerebrovascular Endothelial Dysfunction in Rheumatoid Arthritis: Evidence from the Model of Adjuvant-Induced Arthritis', *Transl Stroke Res*: 10.1007/s12975-019-00699-7.
- Bostrom, P., J. Wu, M. P. Jedrychowski, A. Korde, L. Ye, J. C. Lo, K. A. Rasbach, E. A. Bostrom, J. H. Choi, J. Z. Long, S. Kajimura, M. C. Zingaretti, B. F. Vind, H. Tu, S. Cinti, K. Hojlund, S. P. Gygi, and B. M. Spiegelman. 2012. 'A PGC1-alpha-dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis', *Nature*, 481: 463-8: 10.1038/nature10777.
- Brown, J., C. M. Cooper-Kuhn, G. Kempermann, H. Van Praag, J. Winkler, F. H. Gage, and H. G. Kuhn. 2003. 'Enriched environment and physical activity stimulate hippocampal but not olfactory bulb neurogenesis', *Eur J Neurosci*, 17: 2042-6
- Cabral-Santos, C., C. I. Castrillon, R. A. Miranda, P. A. Monteiro, D. S. Inoue, E. Z. Campos, P. Hofmann, and F. S. Lira. 2016. 'Inflammatory Cytokines and BDNF Response to High-Intensity Intermittent Exercise: Effect the Exercise Volume', *Front Physiol*, 7: 509: 10.3389/fphys.2016.00509.
- Callaghan, C. K., J. Rouine, and S. M. O'Mara. 2017. 'Exercise prevents IFN-alpha-induced mood and cognitive dysfunction and increases BDNF expression in the rat', *Physiol Behav*, 179: 377-83: 10.1016/j.physbeh.2017.07.018.
- Cassilhas, R. C., K. S. Lee, J. Fernandes, M. G. Oliveira, S. Tufik, R. Meeusen, and M. T. de Mello. 2012. 'Spatial memory is improved by aerobic and resistance exercise through divergent molecular mechanisms', *Neuroscience*, 202: 309-17: 10.1016/j.neuroscience.2011.11.029.
- Castren, E., and M. Kojima. 2017. 'Brain-derived neurotrophic factor in mood disorders and antidepressant treatments', *Neurobiol Dis*, 97: 119-26: 10.1016/j.nbd.2016.07.010.
- Cattaneo, A., N. Cattane, V. Begni, C. M. Pariante, and M. A. Riva. 2016. 'The human BDNF gene: peripheral gene expression and protein levels as biomarkers for psychiatric disorders', *Transl Psychiatry*, 6: e958: 10.1038/tp.2016.214.
- Ceccatelli, S., P. Ernfors, M. J. Villar, H. Persson, and T. Hokfelt. 1991. 'Expanded distribution of mRNA for nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, and neurotrophin 3 in the rat brain after colchicine treatment', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88: 10352-6: 10.1073/pnas.88.22.10352.
- Cefis, M., A. Prigent-Tessier, A. Quirie, N. Pernet, C. Marie, and P. Garnier. 2019. 'The effect of exercise on memory and BDNF signaling is dependent on intensity', *Brain Struct Funct*, 224: 1975-85: 10.1007/s00429-019-01889-7.
- Chacon-Fernandez, P., K. Sauberli, M. Colzani, T. Moreau, C. Ghevaert, and Y. A. Barde. 2016. 'Brain-derived Neurotrophic Factor in Megakaryocytes', *J Biol Chem*, 291: 9872-81: 10.1074/jbc.M116.720029.

- Chaddock, G., C. Lam, C. L. Hoad, C. Costigan, E. F. Cox, E. Placidi, I. Thexton, J. Wright, P. E. Blackshaw, A. C. Perkins, L. Marciani, P. A. Gowland, and R. C. Spiller. 2014. 'Novel MRI tests of orocecal transit time and whole gut transit time: studies in normal subjects', *Neurogastroenterol Motil*, 26: 205-14: 10.1111/nmo.12249.
- Chaddock, L., K. I. Erickson, R. S. Prakash, J. S. Kim, M. W. Voss, M. Vanpatter, M. B. Pontifex, L. B. Raine, A. Konkel, C. H. Hillman, N. J. Cohen, and A. F. Kramer. 2010. 'A neuroimaging investigation of the association between aerobic fitness, hippocampal volume, and memory performance in preadolescent children', *Brain Res*, 1358: 172-83: 10.1016/j.brainres.2010.08.049.
- Chao, M. V. 2003. 'Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways', *Nat Rev Neurosci*, 4: 299-309: 10.1038/nrn1078.
- Chen, J., C. Zhang, H. Jiang, Y. Li, L. Zhang, A. Robin, M. Katakowski, M. Lu, and M. Chopp. 2005. 'Atorvastatin induction of VEGF and BDNF promotes brain plasticity after stroke in mice', *J Cereb Blood Flow Metab*, 25: 281-90: 10.1038/sj.jcbfm.9600034.
- Chen, M. J., A. S. Ivy, and A. A. Russo-Neustadt. 2006. 'Nitric oxide synthesis is required for exercise-induced increases in hippocampal BDNF and phosphatidylinositol 3' kinase expression', *Brain Res Bull*, 68: 257-68: 10.1016/j.brainresbull.2005.08.013.
- Chen, Y. C., Q. S. Chen, J. L. Lei, and S. L. Wang. 1998. 'Physical training modifies the age-related decrease of GAP-43 and synaptophysin in the hippocampal formation in C57BL/6J mouse', *Brain Res*, 806: 238-45: 10.1016/s0006-8993(98)00770-7.
- Chen, Z. Y., A. Ieraci, M. Tanowitz, and F. S. Lee. 2005. 'A novel endocytic recycling signal distinguishes biological responses of Trk neurotrophin receptors', *Mol Biol Cell*, 16: 5761-72: 10.1091/mbc.e05-07-0651.
- Chen, Z. Y., P. D. Patel, G. Sant, C. X. Meng, K. K. Teng, B. L. Hempstead, and F. S. Lee. 2004. 'Variant brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (Met66) alters the intracellular trafficking and activity-dependent secretion of wild-type BDNF in neurosecretory cells and cortical neurons', *J Neurosci*, 24: 4401-11: 10.1523/JNEUROSCI.0348-04.2004.
- Chieffi, S., G. Messina, I. Villano, A. Messina, A. Valenzano, F. Moscatelli, M. Salerno, A. Sullo, R. Avola, V. Monda, G. Cibelli, and M. Monda. 2017. 'Neuroprotective Effects of Physical Activity: Evidence from Human and Animal Studies', *Front Neurol*, 8: 188: 10.3389/fneur.2017.00188.
- Clow, C., and B. J. Jasmin. 2010. 'Brain-derived neurotrophic factor regulates satellite cell differentiation and skeletal muscle regeneration', *Mol Biol Cell*, 21: 2182-90: 10.1091/mbc.E10-02-0154.
- Clugnet, M. C., and J. E. LeDoux. 1990. 'Synaptic plasticity in fear conditioning circuits: induction of LTP in the lateral nucleus of the amygdala by stimulation of the medial geniculate body', *J Neurosci*, 10: 2818-24.
- Colcombe, S. J., K. I. Erickson, N. Raz, A. G. Webb, N. J. Cohen, E. McAuley, and A. F. Kramer. 2003. 'Aerobic fitness reduces brain tissue loss in aging humans', *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 58: 176-80: 10.1093/gerona/58.2.m176.
- Colcombe, S. J., K. I. Erickson, P. E. Scalf, J. S. Kim, R. Prakash, E. McAuley, S. Elavsky, D. X. Marquez, L. Hu, and A. F. Kramer. 2006. 'Aerobic exercise training increases brain volume in aging humans', *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 61: 1166-70: 10.1093/gerona/61.11.1166.
- Colombo, E., F. Bedogni, I. Lorenzetti, N. Landsberger, S. C. Previtali, and C. Farina. 2013. 'Autocrine and immune cell-derived BDNF in human skeletal muscle: implications for myogenesis and tissue regeneration', *J Pathol*, 231: 190-8: 10.1002/path.4228.

- Colombo, E., and C. Farina. 2012. 'Star Trk(B): the astrocyte path to neurodegeneration', *Cell Cycle*, 11: 2225-6: 10.4161/cc.20798.
- Colombo, E., S. Romaggi, E. Medico, R. Menon, M. Mora, C. Falcone, H. Lochmuller, P. Confalonieri, R. Mantegazza, L. Morandi, and C. Farina. 2011. 'Human neurotrophin receptor p75NTR defines differentiation-oriented skeletal muscle precursor cells: implications for muscle regeneration', *J Neuropathol Exp Neurol*, 70: 133-42: 10.1097/NEN.0b013e3182084391.
- Conner, J. M., J. C. Lauterborn, and C. M. Gall. 1998. 'Anterograde transport of neurotrophin proteins in the CNS--a reassessment of the neurotrophic hypothesis', *Rev Neurosci*, 9: 91-103
- Conner, J. M., J. C. Lauterborn, Q. Yan, C. M. Gall, and S. Varon. 1997. 'Distribution of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein and mRNA in the normal adult rat CNS: evidence for anterograde axonal transport', *J Neurosci*, 17: 2295-313
- Conover, J. C., and G. D. Yancopoulos. 1997. 'Neurotrophin regulation of the developing nervous system: analyses of knockout mice', *Rev Neurosci*, 8: 13-27
- Corson, D. W., and R. K. Crouch. 1996. 'Physiological activity of retinoids in natural and artificial visual pigments', *Photochem Photobiol*, 63: 595-600
- Costa, M. S., A. P. Ardais, G. T. Fioreze, S. Mioranza, P. H. Botton, D. O. Souza, J. B. Rocha, and L. O. Porciuncula. 2012. 'The impact of the frequency of moderate exercise on memory and brain-derived neurotrophic factor signaling in young adult and middle-aged rats', *Neuroscience*, 222: 100-9: 10.1016/j.neuroscience.2012.06.068.
- Cox, E. P., N. O'Dwyer, R. Cook, M. Vetter, H. L. Cheng, K. Rooney, and H. O'Connor. 2016. 'Relationship between physical activity and cognitive function in apparently healthy young to middle-aged adults: A systematic review', *J Sci Med Sport*, 19: 616-28: 10.1016/j.jsams.2015.09.003.
- Cunha, C., R. Brambilla, and K. L. Thomas. 2010. 'A simple role for BDNF in learning and memory?', *Front Mol Neurosci*, 3: 1: 10.3389/neuro.02.001.2010.
- Cuppini, R., S. Sartini, D. Agostini, M. Guescini, P. Ambrogini, M. Betti, L. Bertini, M. Vallasciani, and V. Stocchi. 2007. 'Bdnf expression in rat skeletal muscle after acute or repeated exercise', *Arch Ital Biol*, 145: 99-110
- Czurko, A., H. Hirase, J. Csicsvari, and G. Buzsaki. 1999. 'Sustained activation of hippocampal pyramidal cells by 'space clamping' in a running wheel', *Eur J Neurosci*, 11: 344-52
- Dai, X., L. D. Lercher, P. M. Clinton, Y. Du, D. L. Livingston, C. Vieira, L. Yang, M. M. Shen, and C. F. Dreyfus. 2003. 'The trophic role of oligodendrocytes in the basal forebrain', *J Neurosci*, 23: 5846-53
- Dalise, S., L. Cavalli, H. Ghuman, B. Wahlberg, M. Gerwig, C. Chisari, F. Ambrosio, and M. Modo. 2017. 'Biological effects of dosing aerobic exercise and neuromuscular electrical stimulation in rats', *Sci Rep*, 7: 10830: 10.1038/s41598-017-11260-7.
- Davis, C. L., P. D. Tomporowski, C. A. Boyle, J. L. Waller, P. H. Miller, J. A. Naglieri, and M. Gregoski. 2007. 'Effects of aerobic exercise on overweight children's cognitive functioning: a randomized controlled trial', *Res Q Exerc Sport*, 78: 510-9: 10.1080/02701367.2007.10599450.
- de Almeida, A. A., S. Gomes da Silva, J. Fernandes, L. F. Peixinho-Pena, F. A. Scorza, E. A. Cavalheiro, and R. M. Arida. 2013. 'Differential effects of exercise intensities in hippocampal BDNF, inflammatory cytokines and cell proliferation in rats during the postnatal brain development', *Neurosci Lett*, 553: 1-6: 10.1016/j.neulet.2013.08.015.

- de Greeff, J. W., R. J. Bosker, J. Oosterlaan, C. Visscher, and E. Hartman. 2018. 'Effects of physical activity on executive functions, attention and academic performance in preadolescent children: a meta-analysis', *J Sci Med Sport*, 21: 501-07: 10.1016/j.jsams.2017.09.595.
- del Zoppo, G. J., and T. Mabuchi. 2003. 'Cerebral microvessel responses to focal ischemia', *J Cereb Blood Flow Metab*, 23: 879-94: 10.1097/01.WCB.0000078322.96027.78.
- Delezie, J., M. Weihrauch, G. Maier, R. Tejero, D. J. Ham, J. F. Gill, B. Karrer-Cardel, M. A. Ruegg, L. Tabares, and C. Handschin. 2019. 'BDNF is a mediator of glycolytic fiber-type specification in mouse skeletal muscle', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 116: 16111-20: 10.1073/pnas.1900544116.
- Deponti, D., R. Buono, G. Catanzaro, C. De Palma, R. Longhi, R. Meneveri, N. Bresolin, M. T. Bassi, G. Cossu, E. Clementi, and S. Brunelli. 2009. 'The low-affinity receptor for neurotrophins p75NTR plays a key role for satellite cell function in muscle repair acting via RhoA', *Mol Biol Cell*, 20: 3620-7: 10.1091/mbc.E09-01-0012.
- Dey, S., R. H. Singh, and P. K. Dey. 1992. 'Exercise training: significance of regional alterations in serotonin metabolism of rat brain in relation to antidepressant effect of exercise', *Physiol Behav*, 52: 1095-9: 10.1016/0031-9384(92)90465-e.
- Dietrich, M. O., Z. B. Andrews, and T. L. Horvath. 2008. 'Exercise-induced synaptogenesis in the hippocampus is dependent on UCP2-regulated mitochondrial adaptation', *J Neurosci*, 28: 10766-71: 10.1523/JNEUROSCI.2744-08.2008.
- Ding, Y. H., J. Li, Y. Zhou, J. A. Rafols, J. C. Clark, and Y. Ding. 2006. 'Cerebral angiogenesis and expression of angiogenic factors in aging rats after exercise', *Curr Neurovasc Res*, 3: 15-23
- Ding, Y., J. Li, J. Clark, F. G. Diaz, and J. A. Rafols. 2003. 'Synaptic plasticity in thalamic nuclei enhanced by motor skill training in rat with transient middle cerebral artery occlusion', *Neurol Res*, 25: 189-94: 10.1179/016164103101201184.
- Ding, Y., J. Li, X. Luan, Y. H. Ding, Q. Lai, J. A. Rafols, J. W. Phillis, J. C. Clark, and F. G. Diaz. 2004. 'Exercise pre-conditioning reduces brain damage in ischemic rats that may be associated with regional angiogenesis and cellular overexpression of neurotrophin', *Neuroscience*, 124: 583-91: 10.1016/j.neuroscience.2003.12.029.
- Dong, M., Y. Wu, Y. Fan, M. Xu, and J. Zhang. 2006. 'c-fos modulates brain-derived neurotrophic factor mRNA expression in mouse hippocampal CA3 and dentate gyrus neurons', *Neurosci Lett*, 400: 177-80: 10.1016/j.neulet.2006.02.063.
- Donovan, M. J., R. C. Miranda, R. Kraemer, T. A. McCaffrey, L. Tessarollo, D. Mahadeo, S. Sharif, D. R. Kaplan, P. Tsoulfas, L. Parada, and et al. 1995. 'Neurotrophin and neurotrophin receptors in vascular smooth muscle cells. Regulation of expression in response to injury', *Am J Pathol*, 147: 309-24
- Doreulee, N., O. A. Sergeeva, Y. Yanovsky, A. N. Chepkova, O. Selbach, A. Godecke, J. Schrader, and H. L. Haas. 2003. 'Cortico-striatal synaptic plasticity in endothelial nitric oxide synthase deficient mice', *Brain Res*, 964: 159-63: 10.1016/s0006-8993(02)04121-5.
- Dougherty, K. D., C. F. Dreyfus, and I. B. Black. 2000. 'Brain-derived neurotrophic factor in astrocytes, oligodendrocytes, and microglia/macrophages after spinal cord injury', *Neurobiol Dis*, 7: 574-85: 10.1006/nbdi.2000.0318.
- Drake, C. T., T. A. Milner, and S. L. Patterson. 1999. 'Ultrastructural localization of full-length trkB immunoreactivity in rat hippocampus suggests multiple roles in modulating activity-dependent synaptic plasticity', *J Neurosci*, 19: 8009-26
- Dugich-Djordjevic, M. M., C. Peterson, F. Isono, F. Ohsawa, H. R. Widmer, T. L. Denton, G. L. Bennett, and F. Hefti. 1995. 'Immunohistochemical visualization of brain-derived

- neurotrophic factor in the rat brain', *Eur J Neurosci*, 7: 1831-9: 10.1111/j.1460-9568.1995.tb00703.x.
- E, L., J. Lu, J. E. Selfridge, J. M. Burns, and R. H. Swerdlow. 2013. 'Lactate administration reproduces specific brain and liver exercise-related changes', *J Neurochem*, 127: 91-100: 10.1111/jnc.12394.
- Eadie, B. D., V. A. Redila, and B. R. Christie. 2005. 'Voluntary exercise alters the cytoarchitecture of the adult dentate gyrus by increasing cellular proliferation, dendritic complexity, and spine density', *J Comp Neurol*, 486: 39-47: 10.1002/cne.20493.
- Egan, M. F., M. Kojima, J. H. Callicott, T. E. Goldberg, B. S. Kolachana, A. Bertolino, E. Zaitsev, B. Gold, D. Goldman, M. Dean, B. Lu, and D. R. Weinberger. 2003. 'The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function', *Cell*, 112: 257-69
- Eide, F. F., E. R. Vining, B. L. Eide, K. Zang, X. Y. Wang, and L. F. Reichardt. 1996. 'Naturally occurring truncated trkB receptors have dominant inhibitory effects on brain-derived neurotrophic factor signaling', *J Neurosci*, 16: 3123-9
- El Hayek, L., M. Khalifeh, V. Zibara, R. Abi Assaad, N. Emmanuel, N. Karnib, R. El-Ghandour, P. Nasrallah, M. Bilen, P. Ibrahim, J. Younes, E. Abou Haidar, N. Barmo, V. Jabre, J. S. Stephan, and S. F. Sleiman. 2019. 'Lactate Mediates the Effects of Exercise on Learning and Memory through SIRT1-Dependent Activation of Hippocampal Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF)', *J Neurosci*, 39: 2369-82: 10.1523/JNEUROSCI.1661-18.2019.
- Elkabes, S., E. M. DiCicco-Bloom, and I. B. Black. 1996. 'Brain microglia/macrophages express neurotrophins that selectively regulate microglial proliferation and function', *J Neurosci*, 16: 2508-21
- Endres, M., K. Gertz, U. Lindauer, J. Katchanov, J. Schultze, H. Schrock, G. Nickenig, W. Kuschinsky, U. Dirnagl, and U. Laufs. 2003. 'Mechanisms of stroke protection by physical activity', *Ann Neurol*, 54: 582-90: 10.1002/ana.10722.
- Eng, C. M., L. H. Smallwood, M. P. Rainiero, M. Lahey, S. R. Ward, and R. L. Lieber. 2008. 'Scaling of muscle architecture and fiber types in the rat hindlimb', *J Exp Biol*, 211: 2336-45: 10.1242/jeb.017640.
- Ennaceur, A., and J. Delacour. 1988. 'A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data', *Behav Brain Res*, 31: 47-59
- Erickson, K. I., R. L. Leckie, and A. M. Weinstein. 2014. 'Physical activity, fitness, and gray matter volume', *Neurobiol Aging*, 35 Suppl 2: S20-8: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.03.034.
- Erickson, K. I., D. L. Miller, and K. A. Roecklein. 2012. 'The aging hippocampus: interactions between exercise, depression, and BDNF', *Neuroscientist*, 18: 82-97: 10.1177/1073858410397054.
- Erickson, K. I., M. W. Voss, R. S. Prakash, C. Basak, A. Szabo, L. Chaddock, J. S. Kim, S. Heo, H. Alves, S. M. White, T. R. Wojcicki, E. Mailey, V. J. Vieira, S. A. Martin, B. D. Pence, J. A. Woods, E. McAuley, and A. F. Kramer. 2011. 'Exercise training increases size of hippocampus and improves memory', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108: 3017-22: 10.1073/pnas.1015950108.
- Ernfors, P., C. F. Ibanez, T. Ebendal, L. Olson, and H. Persson. 1990. 'Molecular cloning and neurotrophic activities of a protein with structural similarities to nerve growth factor: developmental and topographical expression in the brain', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87: 5454-8: 10.1073/pnas.87.14.5454.

- Ernfors, P., K. F. Lee, and R. Jaenisch. 1994. 'Mice lacking brain-derived neurotrophic factor develop with sensory deficits', *Nature*, 368: 147-50: 10.1038/368147a0.
- Ernfors, P., C. Wetmore, L. Olson, and H. Persson. 1990. 'Identification of cells in rat brain and peripheral tissues expressing mRNA for members of the nerve growth factor family', *Neuron*, 5: 511-26: 10.1016/0896-6273(90)90090-3.
- Etnier, J. L., L. Wideman, J. D. Labban, A. T. Piepmeier, D. M. Pendleton, K. K. Dvorak, and K. Becofsky. 2016. 'The Effects of Acute Exercise on Memory and Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF)', *J Sport Exerc Psychol*, 38: 331-40: 10.1123/jsep.2015-0335.
- Evans, G. J. 2007. 'Synaptic signalling in cerebellar plasticity', *Biol Cell*, 99: 363-78: 10.1042/BC20070010.
- Farmer, J., X. Zhao, H. van Praag, K. Wodtke, F. H. Gage, and B. R. Christie. 2004. 'Effects of voluntary exercise on synaptic plasticity and gene expression in the dentate gyrus of adult male Sprague-Dawley rats in vivo', *Neuroscience*, 124: 71-9: 10.1016/j.neuroscience.2003.09.029.
- Fenner, B. M. 2012. 'Truncated TrkB: beyond a dominant negative receptor', *Cytokine Growth Factor Rev*, 23: 15-24: 10.1016/j.cytogfr.2012.01.002.
- Fernandes, J., R. M. Arida, and F. Gomez-Pinilla. 2017. 'Physical exercise as an epigenetic modulator of brain plasticity and cognition', *Neurosci Biobehav Rev*, 80: 443-56: 10.1016/j.neubiorev.2017.06.012.
- Ferrara, N. 2000. 'Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis', *Recent Prog Horm Res*, 55: 15-35; discussion 35-6
- Ferreira, A. F., C. C. Real, A. C. Rodrigues, A. S. Alves, and L. R. Britto. 2010. 'Moderate exercise changes synaptic and cytoskeletal proteins in motor regions of the rat brain', *Brain Res*, 1361: 31-42: 10.1016/j.brainres.2010.09.045.
- Ferreira, A. F., C. C. Real, A. C. Rodrigues, A. S. Alves, and L. R. Britto. 2011. 'Short-term, moderate exercise is capable of inducing structural, BDNF-independent hippocampal plasticity', *Brain Res*, 1425: 111-22: 10.1016/j.brainres.2011.10.004.
- Ferrer-Martinez, A., P. Ruiz-Lozano, and K. R. Chien. 2002. 'Mouse PeP: a novel peroxisomal protein linked to myoblast differentiation and development', *Dev Dyn*, 224: 154-67: 10.1002/dvdy.10099.
- Freitas, D. A., E. Rocha-Vieira, B. A. Soares, L. F. Nonato, S. R. Fonseca, J. B. Martins, V. A. Mendonca, A. C. Lacerda, A. R. Massensini, J. R. Poortmans, R. Meeusen, and H. R. Leite. 2018. 'High intensity interval training modulates hippocampal oxidative stress, BDNF and inflammatory mediators in rats', *Physiol Behav*, 184: 6-11: 10.1016/j.physbeh.2017.10.027.
- Fuchikami, M., S. Yamamoto, S. Morinobu, S. Takei, and S. Yamawaki. 2010. 'Epigenetic regulation of BDNF gene in response to stress', *Psychiatry Investig*, 7: 251-6: 10.4306/pi.2010.7.4.251.
- Fujimura, H., C. A. Altar, R. Chen, T. Nakamura, T. Nakahashi, J. Kambayashi, B. Sun, and N. N. Tandon. 2002. 'Brain-derived neurotrophic factor is stored in human platelets and released by agonist stimulation', *Thromb Haemost*, 87: 728-34
- Gano, L. B., M. Patel, and J. M. Rho. 2014. 'Ketogenic diets, mitochondria, and neurological diseases', *J Lipid Res*, 55: 2211-28: 10.1194/jlr.R048975.
- Garcia-Capdevila, S., I. Portell-Cortes, M. Torras-Garcia, M. Coll-Andreu, and D. Costa-Miserachs. 2009. 'Effects of long-term voluntary exercise on learning and memory

- processes: dependency of the task and level of exercise', *Behav Brain Res*, 202: 162-70: 10.1016/j.bbr.2009.03.020.
- Garcia, C., M. J. Chen, A. A. Garza, C. W. Cotman, and A. Russo-Neustadt. 2003. 'The influence of specific noradrenergic and serotonergic lesions on the expression of hippocampal brain-derived neurotrophic factor transcripts following voluntary physical activity', *Neuroscience*, 119: 721-32
- Gerecke, K. M., Y. Jiao, V. Pagala, and R. J. Smeyne. 2012. 'Exercise does not protect against MPTP-induced neurotoxicity in BDNF haploinsufficient mice', *PLoS One*, 7: e43250: 10.1371/journal.pone.0043250.
- Gomes, C., R. Ferreira, J. George, R. Sanches, D. I. Rodrigues, N. Goncalves, and R. A. Cunha. 2013. 'Activation of microglial cells triggers a release of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) inducing their proliferation in an adenosine A2A receptor-dependent manner: A2A receptor blockade prevents BDNF release and proliferation of microglia', *J Neuroinflammation*, 10: 16: 10.1186/1742-2094-10-16.
- Gomez-Pinilla, F., Z. Ying, P. Opazo, R. R. Roy, and V. R. Edgerton. 2001. 'Differential regulation by exercise of BDNF and NT-3 in rat spinal cord and skeletal muscle', *Eur J Neurosci*, 13: 1078-84
- Gomez-Pinilla, F., Z. Ying, R. R. Roy, R. Molteni, and V. R. Edgerton. 2002. 'Voluntary exercise induces a BDNF-mediated mechanism that promotes neuroplasticity', *J Neurophysiol*, 88: 2187-95: 10.1152/jn.00152.2002.
- Gomez-Pinilla, F., Y. Zhuang, J. Feng, Z. Ying, and G. Fan. 2011. 'Exercise impacts brain-derived neurotrophic factor plasticity by engaging mechanisms of epigenetic regulation', *Eur J Neurosci*, 33: 383-90: 10.1111/j.1460-9568.2010.07508.x.
- Griesbach, G. S., D. A. Hovda, and F. Gomez-Pinilla. 2009. 'Exercise-induced improvement in cognitive performance after traumatic brain injury in rats is dependent on BDNF activation', *Brain Res*, 1288: 105-15: 10.1016/j.brainres.2009.06.045.
- Griesbeck, O., A. S. Parsadanian, M. Sendtner, and H. Thoenen. 1995. 'Expression of neurotrophins in skeletal muscle: quantitative comparison and significance for motoneuron survival and maintenance of function', *J Neurosci Res*, 42: 21-33: 10.1002/jnr.490420104.
- Griffin, E. W., R. G. Bechara, A. M. Birch, and A. M. Kelly. 2009. 'Exercise enhances hippocampal-dependent learning in the rat: evidence for a BDNF-related mechanism', *Hippocampus*, 19: 973-80: 10.1002/hipo.20631.
- Griffin, E. W., S. Mullally, C. Foley, S. A. Warmington, S. M. O'Mara, and A. M. Kelly. 2011. 'Aerobic exercise improves hippocampal function and increases BDNF in the serum of young adult males', *Physiol Behav*, 104: 934-41: 10.1016/j.physbeh.2011.06.005.
- Groth, R., and L. Aanonsen. 2002. 'Spinal brain-derived neurotrophic factor (BDNF) produces hyperalgesia in normal mice while antisense directed against either BDNF or trkB, prevent inflammation-induced hyperalgesia', *Pain*, 100: 171-81: 10.1016/s0304-3959(02)00264-6.
- Guo, S., W. J. Kim, J. Lok, S. R. Lee, E. Besancon, B. H. Luo, M. F. Stins, X. Wang, S. Dedhar, and E. H. Lo. 2008. 'Neuroprotection via matrix-trophic coupling between cerebral endothelial cells and neurons', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 7582-7: 10.1073/pnas.0801105105.
- Han, T. K., Y. H. Leem, and H. S. Kim. 2019. 'Treadmill exercise restores high fat diet-induced disturbance of hippocampal neurogenesis through beta2-adrenergic receptor-

- dependent induction of thioredoxin-1 and brain-derived neurotrophic factor', *Brain Res*, 1707: 154-63: 10.1016/j.brainres.2018.11.035.
- Hansen, K. F., K. Karelina, K. Sakamoto, G. A. Wayman, S. Impey, and K. Obrietan. 2013. 'miRNA-132: a dynamic regulator of cognitive capacity', *Brain Struct Funct*, 218: 817-31: 10.1007/s00429-012-0431-4.
- Hansen, K. F., K. Sakamoto, G. A. Wayman, S. Impey, and K. Obrietan. 2010. 'Transgenic miR132 alters neuronal spine density and impairs novel object recognition memory', *PLoS One*, 5: e15497: 10.1371/journal.pone.0015497.
- Hariri, A. R., T. E. Goldberg, V. S. Mattay, B. S. Kolachana, J. H. Callicott, M. F. Egan, and D. R. Weinberger. 2003. 'Brain-derived neurotrophic factor val66met polymorphism affects human memory-related hippocampal activity and predicts memory performance', *J Neurosci*, 23: 6690-4
- Hartman, W., M. Helan, D. Smelter, V. Sathish, M. Thompson, C. M. Pabelick, B. Johnson, and Y. S. Prakash. 2015. 'Role of Hypoxia-Induced Brain Derived Neurotrophic Factor in Human Pulmonary Artery Smooth Muscle', *PLoS One*, 10: e0129489: 10.1371/journal.pone.0129489.
- Haul, S., A. Godecke, J. Schrader, H. L. Haas, and H. J. Luhmann. 1999. 'Impairment of neocortical long-term potentiation in mice deficient of endothelial nitric oxide synthase', *J Neurophysiol*, 81: 494-7: 10.1152/jn.1999.81.2.494.
- Hillman, C. H., K. I. Erickson, and A. F. Kramer. 2008. 'Be smart, exercise your heart: exercise effects on brain and cognition', *Nat Rev Neurosci*, 9: 58-65: 10.1038/nrn2298.
- Hofer, M., S. R. Pagliusi, A. Hohn, J. Leibrock, and Y. A. Barde. 1990. 'Regional distribution of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the adult mouse brain', *EMBO J*, 9: 2459-64
- Hopkins, M. E., and D. J. Bucci. 2010. 'BDNF expression in perirhinal cortex is associated with exercise-induced improvement in object recognition memory', *Neurobiol Learn Mem*, 94: 278-84: 10.1016/j.nlm.2010.06.006.
- Hopkins, M. E., F. C. Davis, M. R. Vantighem, P. J. Whalen, and D. J. Bucci. 2012. 'Differential effects of acute and regular physical exercise on cognition and affect', *Neuroscience*, 215: 59-68: 10.1016/j.neuroscience.2012.04.056.
- Hopper, R. A., and J. Garthwaite. 2006. 'Tonic and phasic nitric oxide signals in hippocampal long-term potentiation', *J Neurosci*, 26: 11513-21: 10.1523/JNEUROSCI.2259-06.2006.
- Hotting, K., and B. Roder. 2013. 'Beneficial effects of physical exercise on neuroplasticity and cognition', *Neurosci Biobehav Rev*, 37: 2243-57: 10.1016/j.neubiorev.2013.04.005.
- Ieraci, A., A. I. Madaio, A. Mallei, F. S. Lee, and M. Popoli. 2016. 'Brain-Derived Neurotrophic Factor Val66Met Human Polymorphism Impairs the Beneficial Exercise-Induced Neurobiological Changes in Mice', *Neuropsychopharmacology*, 41: 3070-79: 10.1038/npp.2016.120.
- Inoue, K., M. Okamoto, J. Shibato, M. C. Lee, T. Matsui, R. Rakwal, and H. Soya. 2015. 'Long-Term Mild, rather than Intense, Exercise Enhances Adult Hippocampal Neurogenesis and Greatly Changes the Transcriptomic Profile of the Hippocampus', *PLoS One*, 10: e0128720: 10.1371/journal.pone.0128720.
- Ip, F. C., J. Cheung, and N. Y. Ip. 2001. 'The expression profiles of neurotrophins and their receptors in rat and chicken tissues during development', *Neurosci Lett*, 301: 107-10: 10.1016/s0304-3940(01)01603-2.
- Isaacs, K. R., B. J. Anderson, A. A. Alcantara, J. E. Black, and W. T. Greenough. 1992. 'Exercise and the brain: angiogenesis in the adult rat cerebellum after vigorous physical activity and motor skill learning', *J Cereb Blood Flow Metab*, 12: 110-9: 10.1038/jcbfm.1992.14.

- Ishimaru, N., M. Fukuchi, A. Hirai, Y. Chiba, T. Tamura, N. Takahashi, A. Tabuchi, M. Tsuda, and M. Shiraishi. 2010. 'Differential epigenetic regulation of BDNF and NT-3 genes by trichostatin A and 5-aza-2'-deoxycytidine in Neuro-2a cells', *Biochem Biophys Res Commun*, 394: 173-7: 10.1016/j.bbrc.2010.02.139.
- Ishitsuka, K., T. Ago, K. Arimura, K. Nakamura, H. Tokami, N. Makihara, J. Kuroda, M. Kamouchi, and T. Kitazono. 2012. 'Neurotrophin production in brain pericytes during hypoxia: a role of pericytes for neuroprotection', *Microvasc Res*, 83: 352-9: 10.1016/j.mvr.2012.02.009.
- Ivy, A. S., F. G. Rodriguez, C. Garcia, M. J. Chen, and A. A. Russo-Neustadt. 2003. 'Noradrenergic and serotonergic blockade inhibits BDNF mRNA activation following exercise and antidepressant', *Pharmacol Biochem Behav*, 75: 81-8
- Jahangiri, Z., Z. Gholamnezhad, and M. Hosseini. 2019. 'The effects of exercise on hippocampal inflammatory cytokine levels, brain oxidative stress markers and memory impairments induced by lipopolysaccharide in rats', *Metab Brain Dis*, 34: 1157-69: 10.1007/s11011-019-00410-7.
- Jiang, H., S. Huang, X. Li, X. Li, S. Huang, Y. Zhang, and Z. Y. Chen. 2015. 'Endothelial tyrosine kinase receptor B prevents VE-cadherin cleavage and protects against atherosclerotic lesion development in ApoE<sup>-/-</sup> mice', *Oncotarget*, 6: 30640-9: 10.18632/oncotarget.5855.
- Jimenez-Maldonado, A., J. Cerna-Cortes, E. M. Castro-Rodriguez, S. A. Montero, J. Muniz, A. Rodriguez-Hernandez, M. Lemus, and E. R. De Alvarez-Buylla. 2016. 'Effects of moderate- and high-intensity chronic exercise on brain-derived neurotrophic factor expression in fast and slow muscles', *Muscle Nerve*, 53: 446-51: 10.1002/mus.24757.
- Jimenez-Maldonado, A., I. Renteria, P. C. Garcia-Suarez, J. Moncada-Jimenez, and L. F. Freire-Royes. 2018. 'The Impact of High-Intensity Interval Training on Brain Derived Neurotrophic Factor in Brain: A Mini-Review', *Front Neurosci*, 12: 839: 10.3389/fnins.2018.00839.
- Kallmann, B. A., S. Wagner, V. Hummel, M. Buttman, A. Bayas, J. C. Tonn, and P. Rieckmann. 2002. 'Characteristic gene expression profile of primary human cerebral endothelial cells', *FASEB J*, 16: 589-91
- Kamijo, K., M. B. Pontifex, K. C. O'Leary, M. R. Scudder, C. T. Wu, D. M. Castelli, and C. H. Hillman. 2011. 'The effects of an afterschool physical activity program on working memory in preadolescent children', *Dev Sci*, 14: 1046-58: 10.1111/j.1467-7687.2011.01054.x.
- Karege, F., M. Schwald, and M. Cisse. 2002. 'Postnatal developmental profile of brain-derived neurotrophic factor in rat brain and platelets', *Neurosci Lett*, 328: 261-4
- Katoh-Semba, R., I. K. Takeuchi, R. Semba, and K. Kato. 1997. 'Distribution of brain-derived neurotrophic factor in rats and its changes with development in the brain', *J Neurochem*, 69: 34-42: 10.1046/j.1471-4159.1997.69010034.x.
- Katusic, Z. S., and S. A. Austin. 2014. 'Endothelial nitric oxide: protector of a healthy mind', *Eur Heart J*, 35: 888-94: 10.1093/eurheartj/eh544.
- Kawamoto, Y., S. Nakamura, T. Kawamata, I. Akiguchi, and J. Kimura. 1999. 'Cellular localization of brain-derived neurotrophic factor-like immunoreactivity in adult monkey brain', *Brain Res*, 821: 341-9: 10.1016/s0006-8993(99)01082-3.
- Kawamoto, Y., S. Nakamura, S. Nakano, N. Oka, I. Akiguchi, and J. Kimura. 1996. 'Immunohistochemical localization of brain-derived neurotrophic factor in adult rat brain', *Neuroscience*, 74: 1209-26: 10.1016/0306-4522(96)00245-x.

- Keiner, S., O. W. Witte, and C. Redecker. 2009. 'Immunocytochemical detection of newly generated neurons in the perilesional area of cortical infarcts after intraventricular application of brain-derived neurotrophic factor', *J Neuropathol Exp Neurol*, 68: 83-93: 10.1097/NEN.0b013e31819308e9.
- Kim, H., Q. Li, B. L. Hempstead, and J. A. Madri. 2004. 'Paracrine and autocrine functions of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and nerve growth factor (NGF) in brain-derived endothelial cells', *J Biol Chem*, 279: 33538-46: 10.1074/jbc.M404115200.
- Kim, J. K., S. M. Jeon, K. M. Lee, E. S. Park, and H. J. Cho. 2007. 'Expression of brain-derived neurotrophic factor in the rat forebrain and upper brain stem during postnatal development: an immunohistochemical study', *Neuroscience*, 146: 1128-36: 10.1016/j.neuroscience.2007.02.017.
- Kim, S., J. Y. Choi, S. Moon, D. H. Park, H. B. Kwak, and J. H. Kang. 2019. 'Roles of myokines in exercise-induced improvement of neuropsychiatric function', *Pflugers Arch*, 471: 491-505: 10.1007/s00424-019-02253-8.
- Kim, S. E., I. G. Ko, B. K. Kim, M. S. Shin, S. Cho, C. J. Kim, S. H. Kim, S. S. Baek, E. K. Lee, and Y. S. Jee. 2010. 'Treadmill exercise prevents aging-induced failure of memory through an increase in neurogenesis and suppression of apoptosis in rat hippocampus', *Exp Gerontol*, 45: 357-65: 10.1016/j.exger.2010.02.005.
- Kim, Y. P., H. B. Kim, M. H. Jang, B. V. Lim, Y. J. Kim, H. Kim, S. S. Kim, E. H. Kim, and C. J. Kim. 2003. 'Magnitude- and time-dependence of the effect of treadmill exercise on cell proliferation in the dentate gyrus of rats', *Int J Sports Med*, 24: 114-7: 10.1055/s-2003-38202.
- Kimura, T., F. Kaneko, E. Iwamoto, S. Saitoh, and T. Yamada. 2019. 'Neuromuscular electrical stimulation increases serum brain-derived neurotrophic factor in humans', *Exp Brain Res*, 237: 47-56: 10.1007/s00221-018-5396-y.
- Kleim, J. A., N. R. Cooper, and P. M. VandenBerg. 2002. 'Exercise induces angiogenesis but does not alter movement representations within rat motor cortex', *Brain Res*, 934: 1-6: 10.1016/s0006-8993(02)02239-4.
- Klein, A. B., R. Williamson, M. A. Santini, C. Clemmensen, A. Ettrup, M. Rios, G. M. Knudsen, and S. Aznar. 2011. 'Blood BDNF concentrations reflect brain-tissue BDNF levels across species', *Int J Neuropsychopharmacol*, 14: 347-53: 10.1017/S1461145710000738.
- Klein, R., D. Conway, L. F. Parada, and M. Barbacid. 1990. 'The trkB tyrosine protein kinase gene codes for a second neurogenic receptor that lacks the catalytic kinase domain', *Cell*, 61: 647-56
- Klinkenberg, I., and A. Blokland. 2010. 'The validity of scopolamine as a pharmacological model for cognitive impairment: a review of animal behavioral studies', *Neurosci Biobehav Rev*, 34: 1307-50: 10.1016/j.neubiorev.2010.04.001.
- Knubben, K., F. M. Reischies, M. Adli, P. Schlattmann, M. Bauer, and F. Dimeo. 2007. 'A randomised, controlled study on the effects of a short-term endurance training programme in patients with major depression', *Br J Sports Med*, 41: 29-33: 10.1136/bjism.2006.030130.
- Korte, M., P. Carroll, E. Wolf, G. Brem, H. Thoenen, and T. Bonhoeffer. 1995. 'Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92: 8856-60: 10.1073/pnas.92.19.8856.
- Krock, B. L., N. Skuli, and M. C. Simon. 2011. 'Hypoxia-induced angiogenesis: good and evil', *Genes Cancer*, 2: 1117-33: 10.1177/1947601911423654.

- Krupinski, J., J. Kaluza, P. Kumar, S. Kumar, and J. M. Wang. 1994. 'Role of angiogenesis in patients with cerebral ischemic stroke', *Stroke*, 25: 1794-8: 10.1161/01.str.25.9.1794.
- Kunugi, H., A. Ueki, M. Otsuka, K. Isse, H. Hirasawa, N. Kato, T. Nabika, S. Kobayashi, and S. Nanko. 2001. 'A novel polymorphism of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene associated with late-onset Alzheimer's disease', *Mol Psychiatry*, 6: 83-6
- Kwapiszewska, G., K. Chwalek, L. M. Marsh, M. Wygrecka, J. Wilhelm, J. Best, B. Egemnazarov, F. C. Weisel, S. L. Osswald, R. T. Schermuly, A. Olschewski, W. Seeger, N. Weissmann, O. Eickelberg, and L. Fink. 2012. 'BDNF/TrkB signaling augments smooth muscle cell proliferation in pulmonary hypertension', *Am J Pathol*, 181: 2018-29: 10.1016/j.ajpath.2012.08.028.
- Laurenzi, M. A., G. Barbany, T. Timmusk, J. A. Lindgren, and H. Persson. 1994. 'Expression of mRNA encoding neurotrophins and neurotrophin receptors in rat thymus, spleen tissue and immunocompetent cells. Regulation of neurotrophin-4 mRNA expression by mitogens and leukotriene B4', *Eur J Biochem*, 223: 733-41
- Lee, M., and H. Soya. 2017. 'Effects of acute voluntary loaded wheel running on BDNF expression in the rat hippocampus', *J Exerc Nutrition Biochem*, 21: 52-57: 10.20463/jenb.2017.0034.
- Lee, Y., S. W. Lim, S. Y. Kim, J. W. Chung, J. Kim, W. Myung, J. Song, S. Kim, B. J. Carroll, and D. K. Kim. 2013. 'Association between the BDNF Val66Met Polymorphism and Chronicity of Depression', *Psychiatry Investig*, 10: 56-61: 10.4306/pi.2013.10.1.56.
- Leiter, O., S. Seidemann, R. W. Overall, B. Ramasz, N. Rund, S. Schallenberg, T. Grinenko, B. Wielockx, G. Kempermann, and T. L. Walker. 2019. 'Exercise-Induced Activated Platelets Increase Adult Hippocampal Precursor Proliferation and Promote Neuronal Differentiation', *Stem Cell Reports*, 12: 667-79: 10.1016/j.stemcr.2019.02.009.
- Lev-Vachnisch, Y., S. Cadury, A. Rotter-Maskowitz, N. Feldman, A. Roichman, T. Illouz, A. Varvak, R. Nicola, R. Madar, and E. Okun. 2019. 'L-Lactate Promotes Adult Hippocampal Neurogenesis', *Front Neurosci*, 13: 403: 10.3389/fnins.2019.00403.
- Leventhal, C., S. Rafii, D. Rafii, A. Shahar, and S. A. Goldman. 1999. 'Endothelial trophic support of neuronal production and recruitment from the adult mammalian subependyma', *Mol Cell Neurosci*, 13: 450-64: 10.1006/mcne.1999.0762.
- Li, Q., M. C. Ford, E. B. Lavik, and J. A. Madri. 2006. 'Modeling the neurovascular niche: VEGF- and BDNF-mediated cross-talk between neural stem cells and endothelial cells: an in vitro study', *J Neurosci Res*, 84: 1656-68: 10.1002/jnr.21087.
- Li, Y., B. W. Luikart, S. Birnbaum, J. Chen, C. H. Kwon, S. G. Kernie, R. Bassel-Duby, and L. F. Parada. 2008. 'TrkB regulates hippocampal neurogenesis and governs sensitivity to antidepressive treatment', *Neuron*, 59: 399-412: 10.1016/j.neuron.2008.06.023.
- Liem, R. S., N. Brouwer, and J. C. Copray. 2001. 'Ultrastructural localisation of intramuscular expression of BDNF mRNA by silver-gold intensified non-radioactive in situ hybridisation', *Histochem Cell Biol*, 116: 545-51: 10.1007/s00418-001-0349-z.
- Lin, T. W., and Y. M. Kuo. 2013. 'Exercise benefits brain function: the monoamine connection', *Brain Sci*, 3: 39-53: 10.3390/brainsci3010039.
- Lin, Y., X. Lu, J. Dong, X. He, T. Yan, H. Liang, M. Sui, X. Zheng, H. Liu, J. Zhao, and X. Lu. 2015. 'Involuntary, Forced and Voluntary Exercises Equally Attenuate Neurocognitive Deficits in Vascular Dementia by the BDNF-pCREB Mediated Pathway', *Neurochem Res*, 40: 1839-48: 10.1007/s11064-015-1673-3.

- Lindholm, D., E. Castren, M. Berzaghi, A. Blochl, and H. Thoenen. 1994. 'Activity-dependent and hormonal regulation of neurotrophin mRNA levels in the brain--implications for neuronal plasticity', *J Neurobiol*, 25: 1362-72: 10.1002/neu.480251105.
- Linnarsson, S., A. Bjorklund, and P. Ernfors. 1997. 'Learning deficit in BDNF mutant mice', *Eur J Neurosci*, 9: 2581-7: 10.1111/j.1460-9568.1997.tb01687.x.
- Liu, H. L., G. Zhao, K. Cai, H. H. Zhao, and L. D. Shi. 2011. 'Treadmill exercise prevents decline in spatial learning and memory in APP/PS1 transgenic mice through improvement of hippocampal long-term potentiation', *Behav Brain Res*, 218: 308-14: 10.1016/j.bbr.2010.12.030.
- Liu, I. Y., W. E. Lyons, L. A. Mamounas, and R. F. Thompson. 2004. 'Brain-derived neurotrophic factor plays a critical role in contextual fear conditioning', *J Neurosci*, 24: 7958-63: 10.1523/JNEUROSCI.1948-04.2004.
- Liu, Q. R., L. Lu, X. G. Zhu, J. P. Gong, Y. Shaham, and G. R. Uhl. 2006. 'Rodent BDNF genes, novel promoters, novel splice variants, and regulation by cocaine', *Brain Res*, 1067: 1-12: 10.1016/j.brainres.2005.10.004.
- Liu, W., W. Wu, G. Lin, J. Cheng, Y. Zeng, and Y. Shi. 2018. 'Physical exercise promotes proliferation and differentiation of endogenous neural stem cells via ERK in rats with cerebral infarction', *Mol Med Rep*, 18: 1455-64: 10.3892/mmr.2018.9147.
- Liu, Y. F., H. I. Chen, C. L. Wu, Y. M. Kuo, L. Yu, A. M. Huang, F. S. Wu, J. I. Chuang, and C. J. Jen. 2009. 'Differential effects of treadmill running and wheel running on spatial or aversive learning and memory: roles of amygdalar brain-derived neurotrophic factor and synaptotagmin I', *J Physiol*, 587: 3221-31: 10.1113/jphysiol.2009.173088.
- Liu, Y. F., H. I. Chen, L. Yu, Y. M. Kuo, F. S. Wu, J. I. Chuang, P. C. Liao, and C. J. Jen. 2008. 'Upregulation of hippocampal TrkB and synaptotagmin is involved in treadmill exercise-enhanced aversive memory in mice', *Neurobiol Learn Mem*, 90: 81-9: 10.1016/j.nlm.2008.02.005.
- Lomen-Hoerth, C., and E. M. Shooter. 1995. 'Widespread neurotrophin receptor expression in the immune system and other nonneuronal rat tissues', *J Neurochem*, 64: 1780-9: 10.1046/j.1471-4159.1995.64041780.x.
- Lommatzsch, M., A. Braun, A. Mannsfeldt, V. A. Botchkarev, N. V. Botchkareva, R. Paus, A. Fischer, G. R. Lewin, and H. Renz. 1999. 'Abundant production of brain-derived neurotrophic factor by adult visceral epithelia. Implications for paracrine and target-derived Neurotrophic functions', *Am J Pathol*, 155: 1183-93: 10.1016/S0002-9440(10)65221-2.
- Lou, S. J., J. Y. Liu, H. Chang, and P. J. Chen. 2008. 'Hippocampal neurogenesis and gene expression depend on exercise intensity in juvenile rats', *Brain Res*, 1210: 48-55: 10.1016/j.brainres.2008.02.080.
- Lourenco, M. V., R. L. Frozza, G. B. de Freitas, H. Zhang, G. C. Kincheski, F. C. Ribeiro, R. A. Goncalves, J. R. Clarke, D. Beckman, A. Staniszewski, H. Berman, L. A. Guerra, L. Forny-Germano, S. Meier, D. M. Wilcock, J. M. de Souza, S. Alves-Leon, V. F. Prado, M. A. M. Prado, J. F. Abisambra, F. Tovar-Moll, P. Mattos, O. Arancio, S. T. Ferreira, and F. G. De Felice. 2019. 'Exercise-linked FNDC5/irisin rescues synaptic plasticity and memory defects in Alzheimer's models', *Nat Med*, 25: 165-75: 10.1038/s41591-018-0275-4.
- Lu, B., P. T. Pang, and N. H. Woo. 2005. 'The yin and yang of neurotrophin action', *Nat Rev Neurosci*, 6: 603-14: 10.1038/nrn1726.
- Luberg, K., J. Wong, C. S. Weickert, and T. Timmusk. 2010. 'Human TrkB gene: novel alternative transcripts, protein isoforms and expression pattern in the prefrontal cerebral cortex

- during postnatal development', *J Neurochem*, 113: 952-64: 10.1111/j.1471-4159.2010.06662.x.
- Lubin, F. D., T. L. Roth, and J. D. Sweatt. 2008. 'Epigenetic regulation of BDNF gene transcription in the consolidation of fear memory', *J Neurosci*, 28: 10576-86: 10.1523/JNEUROSCI.1786-08.2008.
- Ma, Y. L., H. L. Wang, H. C. Wu, C. L. Wei, and E. H. Lee. 1998. 'Brain-derived neurotrophic factor antisense oligonucleotide impairs memory retention and inhibits long-term potentiation in rats', *Neuroscience*, 82: 957-67: 10.1016/s0306-4522(97)00325-4.
- MacQueen, G. M., K. Ramakrishnan, S. D. Croll, J. A. Siuciak, G. Yu, L. T. Young, and M. Fahnstock. 2001. 'Performance of heterozygous brain-derived neurotrophic factor knockout mice on behavioral analogues of anxiety, nociception, and depression', *Behav Neurosci*, 115: 1145-53
- Madinier, A., N. Bertrand, C. Mossiat, A. Prigent-Tessier, A. Beley, C. Marie, and P. Garnier. 2009. 'Microglial involvement in neuroplastic changes following focal brain ischemia in rats', *PLoS One*, 4: e8101: 10.1371/journal.pone.0008101.
- Maekawa, T., R. Ogasawara, A. Tsutaki, K. Lee, S. Nakada, K. Nakazato, and N. Ishii. 2018. 'Electrically evoked local muscle contractions cause an increase in hippocampal BDNF', *Appl Physiol Nutr Metab*, 43: 491-96: 10.1139/apnm-2017-0536.
- Maisonpierre, P. C., L. Belluscio, B. Friedman, R. F. Alderson, S. J. Wiegand, M. E. Furth, R. M. Lindsay, and G. D. Yancopoulos. 1990. 'NT-3, BDNF, and NGF in the developing rat nervous system: parallel as well as reciprocal patterns of expression', *Neuron*, 5: 501-9
- Maisonpierre, P. C., M. M. Le Beau, R. Espinosa, 3rd, N. Y. Ip, L. Belluscio, S. M. de la Monte, S. Squinto, M. E. Furth, and G. D. Yancopoulos. 1991. 'Human and rat brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3: gene structures, distributions, and chromosomal localizations', *Genomics*, 10: 558-68
- Mandolesi, L., A. Polverino, S. Montuori, F. Foti, G. Ferraioli, P. Sorrentino, and G. Sorrentino. 2018. 'Effects of Physical Exercise on Cognitive Functioning and Wellbeing: Biological and Psychological Benefits', *Front Psychol*, 9: 509: 10.3389/fpsyg.2018.00509.
- Marie, C., M. Pedard, A. Quirie, A. Tessier, P. Garnier, P. Totoson, and C. Demougeot. 2018. 'Brain-derived neurotrophic factor secreted by the cerebral endothelium: A new actor of brain function?', *J Cereb Blood Flow Metab*, 38: 935-49: 10.1177/0271678X18766772.
- Marosi, K., S. W. Kim, K. Moehl, M. Scheibye-Knudsen, A. Cheng, R. Cutler, S. Camandola, and M. P. Mattson. 2016. '3-Hydroxybutyrate regulates energy metabolism and induces BDNF expression in cerebral cortical neurons', *J Neurochem*, 139: 769-81: 10.1111/jnc.13868.
- Martinsen, E. W. 1990. 'Benefits of exercise for the treatment of depression', *Sports Med*, 9: 380-9: 10.2165/00007256-199009060-00006.
- Matsuda, F., H. Sakakima, and Y. Yoshida. 2011. 'The effects of early exercise on brain damage and recovery after focal cerebral infarction in rats', *Acta Physiol (Oxf)*, 201: 275-87: 10.1111/j.1748-1708.2010.02174.x.
- Matsumoto, T., S. Rauskolb, M. Polack, J. Klose, R. Kolbeck, M. Korte, and Y. A. Barde. 2008. 'Biosynthesis and processing of endogenous BDNF: CNS neurons store and secrete BDNF, not pro-BDNF', *Nat Neurosci*, 11: 131-3: 10.1038/nn2038.
- Matthews, V. B., M. B. Astrom, M. H. Chan, C. R. Bruce, K. S. Krabbe, O. Prelovsek, T. Akerstrom, C. Yfanti, C. Broholm, O. H. Mortensen, M. Penkowa, P. Hojman, A. Zankari, M. J. Watt, H. Bruunsgaard, B. K. Pedersen, and M. A. Febbraio. 2009. 'Brain-derived neurotrophic

- factor is produced by skeletal muscle cells in response to contraction and enhances fat oxidation via activation of AMP-activated protein kinase', *Diabetologia*, 52: 1409-18: 10.1007/s00125-009-1364-1.
- Mellstrom, B., B. Torres, W. A. Link, and J. R. Naranjo. 2004. 'The BDNF gene: exemplifying complexity in Ca<sup>2+</sup>-dependent gene expression', *Crit Rev Neurobiol*, 16: 43-9
- Metsis, M., T. Timmusk, E. Arenas, and H. Persson. 1993. 'Differential usage of multiple brain-derived neurotrophic factor promoters in the rat brain following neuronal activation', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90: 8802-6: 10.1073/pnas.90.19.8802.
- Meuchel, L. W., M. A. Thompson, S. D. Cassivi, C. M. Pabelick, and Y. S. Prakash. 2011. 'Neurotrophins induce nitric oxide generation in human pulmonary artery endothelial cells', *Cardiovasc Res*, 91: 668-76: 10.1093/cvr/cvr107.
- Miyamoto, T., K. Kou, H. Yanamoto, S. Hashimoto, M. Ikawa, T. Sekiyama, Y. Nakano, S. I. Kashiwamura, C. Takeda, and H. Fujioka. 2018. 'Effect of Neuromuscular Electrical Stimulation on Brain-derived Neurotrophic Factor', *Int J Sports Med*, 39: 5-11: 10.1055/s-0043-120343.
- Mizuno, M., K. Yamada, A. Olariu, H. Nawa, and T. Nabeshima. 2000. 'Involvement of brain-derived neurotrophic factor in spatial memory formation and maintenance in a radial arm maze test in rats', *J Neurosci*, 20: 7116-21
- Molteni, R., Z. Ying, and F. Gomez-Pinilla. 2002. 'Differential effects of acute and chronic exercise on plasticity-related genes in the rat hippocampus revealed by microarray', *Eur J Neurosci*, 16: 1107-16
- Momose, Y., M. Murata, K. Kobayashi, M. Tachikawa, Y. Nakabayashi, I. Kanazawa, and T. Toda. 2002. 'Association studies of multiple candidate genes for Parkinson's disease using single nucleotide polymorphisms', *Ann Neurol*, 51: 133-6
- Monnier, A., P. Garnier, A. Quirie, N. Pernet, C. Demougeot, C. Marie, and A. Prigent-Tessier. 2017. 'Effect of short-term exercise training on brain-derived neurotrophic factor signaling in spontaneously hypertensive rats', *J Hypertens*, 35: 279-90: 10.1097/HJH.0000000000001164.
- Monnier, A., A. Prigent-Tessier, A. Quirie, N. Bertrand, S. Savary, C. Gondcaille, P. Garnier, C. Demougeot, and C. Marie. 2017. 'Brain-derived neurotrophic factor of the cerebral microvasculature: a forgotten and nitric oxide-dependent contributor of brain-derived neurotrophic factor in the brain', *Acta Physiol (Oxf)*, 219: 790-802: 10.1111/apha.12743.
- Moon, H. Y., A. Becke, D. Berron, B. Becker, N. Sah, G. Benoni, E. Janke, S. T. Lubejko, N. H. Greig, J. A. Mattison, E. Duzel, and H. van Praag. 2016. 'Running-Induced Systemic Cathepsin B Secretion Is Associated with Memory Function', *Cell Metab*, 24: 332-40: 10.1016/j.cmet.2016.05.025.
- Morland, C., K. A. Andersson, O. P. Haugen, A. Hadzic, L. Kleppa, A. Gille, J. E. Rinholm, V. Palibrk, E. H. Diget, L. H. Kennedy, T. Stolen, E. Hennestad, O. Moldestad, Y. Cai, M. Puchades, S. Offermanns, K. Vervaeke, M. Bjoras, U. Wisloff, J. Storm-Mathisen, and L. H. Bergersen. 2017. 'Exercise induces cerebral VEGF and angiogenesis via the lactate receptor HCAR1', *Nat Commun*, 8: 15557: 10.1038/ncomms15557.
- Morris, R. 1984. 'Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat', *J Neurosci Methods*, 11: 47-60
- Mousavi, K., and B. J. Jasmin. 2006. 'BDNF is expressed in skeletal muscle satellite cells and inhibits myogenic differentiation', *J Neurosci*, 26: 5739-49: 10.1523/JNEUROSCI.5398-05.2006.

- Mowla, S. J., H. F. Farhadi, S. Pareek, J. K. Atwal, S. J. Morris, N. G. Seidah, and R. A. Murphy. 2001. 'Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor', *J Biol Chem*, 276: 12660-6: 10.1074/jbc.M008104200.
- Mowla, S. J., S. Pareek, H. F. Farhadi, K. Petrecca, J. P. Fawcett, N. G. Seidah, S. J. Morris, W. S. Sossin, and R. A. Murphy. 1999. 'Differential sorting of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in hippocampal neurons', *J Neurosci*, 19: 2069-80
- Munkholm, K., B. K. Pedersen, L. V. Kessing, and M. Vinberg. 2014. 'Elevated levels of plasma brain derived neurotrophic factor in rapid cycling bipolar disorder patients', *Psychoneuroendocrinology*, 47: 199-211: 10.1016/j.psyneuen.2014.05.011.
- Nakahashi, T., H. Fujimura, C. A. Altar, J. Li, J. Kambayashi, N. N. Tandon, and B. Sun. 2000. 'Vascular endothelial cells synthesize and secrete brain-derived neurotrophic factor', *FEBS Lett*, 470: 113-7
- Navaratna, D., S. Z. Guo, K. Hayakawa, X. Wang, C. Gerhardinger, and E. H. Lo. 2011. 'Decreased cerebrovascular brain-derived neurotrophic factor-mediated neuroprotection in the diabetic brain', *Diabetes*, 60: 1789-96: 10.2337/db10-1371.
- Neeper, S. A., F. Gomez-Pinilla, J. Choi, and C. Cotman. 1995. 'Exercise and brain neurotrophins', *Nature*, 373: 109: 10.1038/373109a0.
- Nemoto, K., K. Fukamachi, F. Nemoto, S. Miyata, M. Hamada, Y. Nakamura, E. Senba, and T. Ueyama. 1998. 'Gene expression of neurotrophins and their receptors in cultured rat vascular smooth muscle cells', *Biochem Biophys Res Commun*, 245: 284-8: 10.1006/bbrc.1998.8418.
- Newman, J. C., A. J. Covarrubias, M. Zhao, X. Yu, P. Gut, C. P. Ng, Y. Huang, S. Haldar, and E. Verdin. 2017. 'Ketogenic Diet Reduces Midlife Mortality and Improves Memory in Aging Mice', *Cell Metab*, 26: 547-57 e8: 10.1016/j.cmet.2017.08.004.
- Newman, J. C., and E. Verdin. 2014. 'Ketone bodies as signaling metabolites', *Trends Endocrinol Metab*, 25: 42-52: 10.1016/j.tem.2013.09.002.
- Nishijima, T., M. Okamoto, T. Matsui, I. Kita, and H. Soya. 2012. 'Hippocampal functional hyperemia mediated by NMDA receptor/NO signaling in rats during mild exercise', *J Appl Physiol (1985)*, 112: 197-203: 10.1152/jappphysiol.00763.2011.
- Njung'e, K., and S. L. Handley. 1991. 'Evaluation of marble-burying behavior as a model of anxiety', *Pharmacol Biochem Behav*, 38: 63-7: 10.1016/0091-3057(91)90590-x.
- Nock, N. L., S. Minnes, and J. L. Alberts. 2017. 'Neurobiology of substance use in adolescents and potential therapeutic effects of exercise for prevention and treatment of substance use disorders', *Birth Defects Res*, 109: 1711-29: 10.1002/bdr2.1182.
- Noga, O., M. Peiser, M. Altenahr, H. Knieling, R. Wanner, G. Hanf, R. Grosse, and N. Suttorp. 2007. 'Differential activation of dendritic cells by nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor', *Clin Exp Allergy*, 37: 1701-8: 10.1111/j.1365-2222.2007.02832.x.
- O'Callaghan, R. M., R. Ohle, and A. M. Kelly. 2007. 'The effects of forced exercise on hippocampal plasticity in the rat: A comparison of LTP, spatial- and non-spatial learning', *Behav Brain Res*, 176: 362-6: 10.1016/j.bbr.2006.10.018.
- Oberlin, L. E., A. M. Waiwood, T. B. Cumming, A. L. Marsland, J. Bernhardt, and K. I. Erickson. 2017. 'Effects of Physical Activity on Poststroke Cognitive Function: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials', *Stroke*, 48: 3093-100: 10.1161/STROKEAHA.117.017319.
- Ogborn, D. I., and P. F. Gardiner. 2010. 'Effects of exercise and muscle type on BDNF, NT-4/5, and TrKB expression in skeletal muscle', *Muscle Nerve*, 41: 385-91: 10.1002/mus.21503.

- Ohira, K., N. Funatsu, K. J. Homma, Y. Sahara, M. Hayashi, T. Kaneko, and S. Nakamura. 2007. 'Truncated TrkB-T1 regulates the morphology of neocortical layer I astrocytes in adult rat brain slices', *Eur J Neurosci*, 25: 406-16: 10.1111/j.1460-9568.2007.05282.x.
- Ohira, K., and M. Hayashi. 2009. 'A new aspect of the TrkB signaling pathway in neural plasticity', *Curr Neuropharmacol*, 7: 276-85: 10.2174/157015909790031210.
- Ohira, K., H. Kumanogoh, Y. Sahara, K. J. Homma, H. Hirai, S. Nakamura, and M. Hayashi. 2005. 'A truncated tropomyosin-related kinase B receptor, T1, regulates glial cell morphology via Rho GDP dissociation inhibitor 1', *J Neurosci*, 25: 1343-53: 10.1523/JNEUROSCI.4436-04.2005.
- Ohira, K., K. Shimizu, and M. Hayashi. 1999. 'Change of expression of full-length and truncated TrkB in the developing monkey central nervous system', *Brain Res Dev Brain Res*, 112: 21-9
- Okada, S., M. Yokoyama, H. Toko, K. Tateno, J. Moriya, I. Shimizu, A. Nojima, T. Ito, Y. Yoshida, Y. Kobayashi, H. Katagiri, T. Minamino, and I. Komuro. 2012. 'Brain-derived neurotrophic factor protects against cardiac dysfunction after myocardial infarction via a central nervous system-mediated pathway', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 32: 1902-9: 10.1161/ATVBAHA.112.248930.
- Oloff, H. S., N. C. Berchtold, P. Isackson, and C. W. Cotman. 1998. 'Exercise-induced regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) transcripts in the rat hippocampus', *Brain Res Mol Brain Res*, 61: 147-53
- Otani, K., M. Okada, and H. Yamawaki. 2015. 'Expression pattern and function of tyrosine receptor kinase B isoforms in rat mesenteric arterial smooth muscle cells', *Biochem Biophys Res Commun*, 467: 683-9: 10.1016/j.bbrc.2015.10.084.
- Otani, K., M. Okada, and H. Yamawaki. 2017. 'Diverse distribution of tyrosine receptor kinase B isoforms in rat multiple tissues', *J Vet Med Sci*, 79: 1516-23: 10.1292/jvms.17-0257.
- Overall, R. W., T. L. Walker, O. Leiter, S. Lenke, S. Ruhwald, and G. Kempermann. 2013. 'Delayed and transient increase of adult hippocampal neurogenesis by physical exercise in DBA/2 mice', *PLoS One*, 8: e83797: 10.1371/journal.pone.0083797.
- Ozcelik, T., A. Rosenthal, and U. Francke. 1991. 'Chromosomal mapping of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 genes in man and mouse', *Genomics*, 10: 569-75
- Paillard, T., Y. Rolland, and P. de Souto Barreto. 2015. 'Protective Effects of Physical Exercise in Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease: A Narrative Review', *J Clin Neurol*, 11: 212-9: 10.3988/jcn.2015.11.3.212.
- Palomer, E., J. Carretero, S. Benvegnu, C. G. Dotti, and M. G. Martin. 2016. 'Neuronal activity controls Bdnf expression via Polycomb de-repression and CREB/CBP/JMJD3 activation in mature neurons', *Nat Commun*, 7: 11081: 10.1038/ncomms11081.
- Pan-Vazquez, A., N. Rye, M. Ameri, B. McSparron, G. Smallwood, J. Bickerdyke, A. Rathbone, F. Dajas-Bailador, and M. Toledo-Rodriguez. 2015. 'Impact of voluntary exercise and housing conditions on hippocampal glucocorticoid receptor, miR-124 and anxiety', *Mol Brain*, 8: 40: 10.1186/s13041-015-0128-8.
- Pan, B. T., and R. M. Johnstone. 1983. 'Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor', *Cell*, 33: 967-78: 10.1016/0092-8674(83)90040-5.
- Pang, P. T., G. Nagappan, W. Guo, and B. Lu. 2016. 'Extracellular and intracellular cleavages of proBDNF required at two distinct stages of late-phase LTP', *NPJ Sci Learn*, 1: 16003: 10.1038/npjscilearn.2016.3.

- Pang, P. T., H. K. Teng, E. Zaitsev, N. T. Woo, K. Sakata, S. Zhen, K. K. Teng, W. H. Yung, B. L. Hempstead, and B. Lu. 2004. 'Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity', *Science*, 306: 487-91: 10.1126/science.1100135.
- Paoli, A., A. Bianco, E. Damiani, and G. Bosco. 2014. 'Ketogenic diet in neuromuscular and neurodegenerative diseases', *Biomed Res Int*, 2014: 474296: 10.1155/2014/474296.
- Park, J. K., S. J. Lee, and T. W. Kim. 2014. 'Treadmill exercise enhances NMDA receptor expression in schizophrenia mice', *J Exerc Rehabil*, 10: 15-21: 10.12965/jer.140088.
- Patterson, S. L., T. Abel, T. A. Deuel, K. C. Martin, J. C. Rose, and E. R. Kandel. 1996. 'Recombinant BDNF rescues deficits in basal synaptic transmission and hippocampal LTP in BDNF knockout mice', *Neuron*, 16: 1137-45
- Pedard, M., M. Cefis, G. Ennequin, A. Quirie, P. Garnier, A. Prigent-Tessier, N. Pernet, and C. Marie. 2019. 'Brain-derived Neurotrophic Factor Pathway after Downhill and Uphill Training in Rats', *Med Sci Sports Exerc*, 51: 27-34: 10.1249/MSS.0000000000001771.
- Pedard, M., A. Quirie, P. Garnier, A. Tessier, C. Demougeot, and C. Marie. 2017. 'The Cerebral Brain-Derived Neurotrophic Factor Pathway, Either Neuronal or Endothelial, Is Impaired in Rats with Adjuvant-Induced Arthritis. Connection with Endothelial Dysfunction', *Front Physiol*, 8: 1125: 10.3389/fphys.2017.01125.
- Pedard, M., A. Quirie, P. Totoston, F. Verhoeven, P. Garnier, A. Tessier, C. Demougeot, and C. Marie. 2018. 'Vascular brain-derived neurotrophic factor pathway in rats with adjuvant-induced arthritis: Effect of anti-rheumatic drugs', *Atherosclerosis*, 274: 77-85: 10.1016/j.atherosclerosis.2018.05.004.
- Pedersen, B. K. 2009. 'The disease of physical inactivity--and the role of myokines in muscle-fat cross talk', *J Physiol*, 587: 5559-68: 10.1113/jphysiol.2009.179515.
- Pedersen, B. K. 2019. 'Physical activity and muscle-brain crosstalk', *Nat Rev Endocrinol*: 10.1038/s41574-019-0174-x.
- Pereira, A. C., D. E. Huddleston, A. M. Brickman, A. A. Sosunov, R. Hen, G. M. McKhann, R. Sloan, F. H. Gage, T. R. Brown, and S. A. Small. 2007. 'An in vivo correlate of exercise-induced neurogenesis in the adult dentate gyrus', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104: 5638-43: 10.1073/pnas.0611721104.
- Perez, M. T., and E. Caminos. 1995. 'Expression of brain-derived neurotrophic factor and of its functional receptor in neonatal and adult rat retina', *Neurosci Lett*, 183: 96-9
- Phillips, H. S., J. M. Hains, G. R. Laramée, A. Rosenthal, and J. W. Winslow. 1990. 'Widespread expression of BDNF but not NT3 by target areas of basal forebrain cholinergic neurons', *Science*, 250: 290-4: 10.1126/science.1688328.
- Ploughman, M., S. Granter-Button, G. Chernenko, B. A. Tucker, K. M. Mearow, and D. Corbett. 2005. 'Endurance exercise regimens induce differential effects on brain-derived neurotrophic factor, synapsin-I and insulin-like growth factor I after focal ischemia', *Neuroscience*, 136: 991-1001: 10.1016/j.neuroscience.2005.08.037.
- Plunzevic, J. 2012. 'Influence of the physical activity on the cognitive functions with people depending on their age', *Med Arch*, 66: 271-5
- Pohl, U., J. Holtz, R. Busse, and E. Bassenge. 1986. 'Crucial role of endothelium in the vasodilator response to increased flow in vivo', *Hypertension*, 8: 37-44: 10.1161/01.hyp.8.1.37.
- Prigent-Tessier, A., A. Quirie, K. Maguin-Gate, J. Szostak, C. Mossiat, M. Nappey, S. Devaux, C. Marie, and C. Demougeot. 2013. 'Physical training and hypertension have opposite effects on endothelial brain-derived neurotrophic factor expression', *Cardiovasc Res*, 100: 374-82: 10.1093/cvr/cvt219.

- Querido, J. S., and A. W. Sheel. 2007. 'Regulation of cerebral blood flow during exercise', *Sports Med*, 37: 765-82: 10.2165/00007256-200737090-00002.
- Quinn, L. S., B. G. Anderson, J. D. Conner, and T. Wolden-Hanson. 2015. 'Circulating irisin levels and muscle FNDC5 mRNA expression are independent of IL-15 levels in mice', *Endocrine*, 50: 368-77: 10.1007/s12020-015-0607-9.
- Quirie, A., M. Hervieu, P. Garnier, C. Demougeot, C. Mossiat, N. Bertrand, A. Martin, C. Marie, and A. Prigent-Tessier. 2012. 'Comparative effect of treadmill exercise on mature BDNF production in control versus stroke rats', *PLoS One*, 7: e44218: 10.1371/journal.pone.0044218.
- Rasmussen, P., P. Brassard, H. Adser, M. V. Pedersen, L. Leick, E. Hart, N. H. Secher, B. K. Pedersen, and H. Pilegaard. 2009. 'Evidence for a release of brain-derived neurotrophic factor from the brain during exercise', *Exp Physiol*, 94: 1062-9: 10.1113/expphysiol.2009.048512.
- Reichardt, L. F. 2006. 'Neurotrophin-regulated signalling pathways', *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 361: 1545-64: 10.1098/rstb.2006.1894.
- Reisi, P., S. Babri, H. Alaei, M. R. Sharifi, G. Mohaddes, S. M. Noorbakhsh, and R. Lashgari. 2010. 'Treadmill running improves long-term potentiation (LTP) defects in streptozotocin-induced diabetes at dentate gyrus in rats', *Pathophysiology*, 17: 33-8: 10.1016/j.pathophys.2009.06.001.
- Ricci, A., E. Bronzetti, F. Mannino, L. Felici, C. Terzano, and S. Mariotta. 2004. 'Elevated neurotrophin and neurotrophin receptor expression in spontaneously hypertensive rat lungs', *Growth Factors*, 22: 195-205
- Rodier, M., A. Prigent-Tessier, Y. Bejot, A. Jacquin, C. Mossiat, C. Marie, and P. Garnier. 2014. 'Exogenous t-PA administration increases hippocampal mature BDNF levels. plasmin- or NMDA-dependent mechanism?', *PLoS One*, 9: e92416: 10.1371/journal.pone.0092416.
- Rosas-Vargas, H., J. D. Martinez-Ezquerro, and T. Bienvenu. 2011. 'Brain-derived neurotrophic factor, food intake regulation, and obesity', *Arch Med Res*, 42: 482-94: 10.1016/j.arcmed.2011.09.005.
- Rose, C. R., R. Blum, B. Pichler, A. Lepier, K. W. Kafitz, and A. Konnerth. 2003. 'Truncated TrkB-T1 mediates neurotrophin-evoked calcium signalling in glia cells', *Nature*, 426: 74-8: 10.1038/nature01983.
- Rosenfeld, R. D., L. Zeni, M. Haniu, J. Talvenheimo, S. F. Radka, L. Bennett, J. A. Miller, and A. A. Welcher. 1995. 'Purification and identification of brain-derived neurotrophic factor from human serum', *Protein Expr Purif*, 6: 465-71
- Roux, P. P., and P. A. Barker. 2002. 'Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor', *Prog Neurobiol*, 67: 203-33
- Rubanyi, G. M., J. C. Romero, and P. M. Vanhoutte. 1986. 'Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor', *Am J Physiol*, 250: H1145-9: 10.1152/ajpheart.1986.250.6.H1145.
- Ruprecht, K., C. Stadelmann, V. Hummel, O. Klein, W. Bruck, and P. Rieckmann. 2002. 'Brain derived neurotrophic factor does not act on adult human cerebral endothelial cells', *Neurosci Lett*, 330: 175-8
- Russo-Neustadt, A. A., H. Alejandro, C. Garcia, A. S. Ivy, and M. J. Chen. 2004. 'Hippocampal brain-derived neurotrophic factor expression following treatment with reboxetine, citalopram, and physical exercise', *Neuropsychopharmacology*, 29: 2189-99: 10.1038/sj.npp.1300514.

- Russo-Neustadt, A. A., R. C. Beard, Y. M. Huang, and C. W. Cotman. 2000. 'Physical activity and antidepressant treatment potentiate the expression of specific brain-derived neurotrophic factor transcripts in the rat hippocampus', *Neuroscience*, 101: 305-12: 10.1016/S0306-4522(00)00349-3.
- Russo-Neustadt, A., R. C. Beard, and C. W. Cotman. 1999. 'Exercise, antidepressant medications, and enhanced brain derived neurotrophic factor expression', *Neuropsychopharmacology*, 21: 679-82: 10.1016/S0893-133X(99)00059-7.
- Safdar, A., A. Saleem, and M. A. Tarnopolsky. 2016. 'The potential of endurance exercise-derived exosomes to treat metabolic diseases', *Nat Rev Endocrinol*, 12: 504-17: 10.1038/nrendo.2016.76.
- Sakuma, K., K. Watanabe, M. Sano, I. Uramoto, H. Nakano, Y. J. Li, S. Kaneda, Y. Sorimachi, K. Yoshimoto, M. Yasuhara, and T. Totsuka. 2001. 'A possible role for BDNF, NT-4 and TrkB in the spinal cord and muscle of rat subjected to mechanical overload, bupivacaine injection and axotomy', *Brain Res*, 907: 1-19
- Sandrini, L., A. Ieraci, P. Amadio, F. Veglia, M. Popoli, F. S. Lee, E. Tremoli, and S. S. Barbieri. 2018. 'Sub-Chronic Stress Exacerbates the Pro-Thrombotic Phenotype in BDNF(Val/Met) Mice: Gene-Environment Interaction in the Modulation of Arterial Thrombosis', *Int J Mol Sci*, 19: 10.3390/ijms19103235.
- Santhanam, A. V., L. A. Smith, and Z. S. Katusic. 2010. 'Brain-derived neurotrophic factor stimulates production of prostacyclin in cerebral arteries', *Stroke*, 41: 350-6: 10.1161/STROKEAHA.109.564492.
- Sato, Y., Y. Chin, T. Kato, Y. Tanaka, Y. Tozuka, M. Mase, N. Ageyama, F. Ono, K. Terao, Y. Yoshikawa, and T. Hisatsune. 2009. 'White matter activated glial cells produce BDNF in a stroke model of monkeys', *Neurosci Res*, 65: 71-8: 10.1016/j.neures.2009.05.010.
- Saunders, D. H., C. A. Greig, and G. E. Mead. 2014. 'Physical activity and exercise after stroke: review of multiple meaningful benefits', *Stroke*, 45: 3742-7: 10.1161/STROKEAHA.114.004311.
- Schaaf, M. J., J. de Jong, E. R. de Kloet, and E. Vreugdenhil. 1998. 'Downregulation of BDNF mRNA and protein in the rat hippocampus by corticosterone', *Brain Res*, 813: 112-20: 10.1016/S0006-8993(98)01010-5.
- Schiaffino, S., and C. Reggiani. 2011. 'Fiber types in mammalian skeletal muscles', *Physiol Rev*, 91: 1447-531: 10.1152/physrev.00031.2010.
- Schmidt-Kastner, R., C. Wetmore, and L. Olson. 1996. 'Comparative study of brain-derived neurotrophic factor messenger RNA and protein at the cellular level suggests multiple roles in hippocampus, striatum and cortex', *Neuroscience*, 74: 161-83: 10.1016/0306-4522(96)00093-0.
- Seifert, T., P. Brassard, M. Wissenberg, P. Rasmussen, P. Nordby, B. Stallknecht, H. Adser, A. H. Jakobsen, H. Pilegaard, H. B. Nielsen, and N. H. Secher. 2010. 'Endurance training enhances BDNF release from the human brain', *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 298: R372-7: 10.1152/ajpregu.00525.2009.
- Sheikhzadeh, F., A. Etemad, S. Khoshghadam, N. A. Asl, and P. Zare. 2015. 'Hippocampal BDNF content in response to short- and long-term exercise', *Neurol Sci*, 36: 1163-6: 10.1007/s10072-015-2208-z.
- Shi, L. H., F. Luo, D. J. Woodward, and J. Y. Chang. 2004. 'Neural responses in multiple basal ganglia regions during spontaneous and treadmill locomotion tasks in rats', *Exp Brain Res*, 157: 303-14: 10.1007/s00221-004-1844-y.

- Shieh, P. B., and A. Ghosh. 1999. 'Molecular mechanisms underlying activity-dependent regulation of BDNF expression', *J Neurobiol*, 41: 127-34
- Shih, P. C., Y. R. Yang, and R. Y. Wang. 2013. 'Effects of exercise intensity on spatial memory performance and hippocampal synaptic plasticity in transient brain ischemic rats', *PLoS One*, 8: e78163: 10.1371/journal.pone.0078163.
- Silhol, M., V. Bonnichon, F. Rage, and L. Tapia-Arancibia. 2005. 'Age-related changes in brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase receptor isoforms in the hippocampus and hypothalamus in male rats', *Neuroscience*, 132: 613-24: 10.1016/j.neuroscience.2005.01.008.
- Siniscalco, D., C. Giordano, F. Rossi, S. Maione, and V. de Novellis. 2011. 'Role of neurotrophins in neuropathic pain', *Curr Neuropharmacol*, 9: 523-9: 10.2174/157015911798376208.
- Skelton, M. R., T. L. Schaefer, N. R. Herring, C. E. Grace, C. V. Vorhees, and M. T. Williams. 2009. 'Comparison of the developmental effects of 5-methoxy-N,N-diisopropyltryptamine (Foxy) to (+/-)-3,4-methylenedioxymethamphetamine (ecstasy) in rats', *Psychopharmacology (Berl)*, 204: 287-97: 10.1007/s00213-009-1459-x.
- Sleiman, S. F., J. Henry, R. Al-Haddad, L. El Hayek, E. Abou Haidar, T. Stringer, D. Ulja, S. S. Karuppagounder, E. B. Holson, R. R. Ratan, I. Ninan, and M. V. Chao. 2016. 'Exercise promotes the expression of brain derived neurotrophic factor (BDNF) through the action of the ketone body beta-hydroxybutyrate', *Elife*, 5: 10.7554/eLife.15092.
- Slusher, A. L., V. T. Patterson, C. S. Schwartz, and E. O. Acevedo. 2018. 'Impact of high intensity interval exercise on executive function and brain derived neurotrophic factor in healthy college aged males', *Physiol Behav*, 191: 116-22: 10.1016/j.physbeh.2018.04.018.
- So, J. H., C. Huang, M. Ge, G. Cai, L. Zhang, Y. Lu, and Y. Mu. 2017. 'Intense Exercise Promotes Adult Hippocampal Neurogenesis But Not Spatial Discrimination', *Front Cell Neurosci*, 11: 13: 10.3389/fncel.2017.00013.
- Sofi, F., D. Valecchi, D. Bacci, R. Abbate, G. F. Gensini, A. Casini, and C. Macchi. 2011. 'Physical activity and risk of cognitive decline: a meta-analysis of prospective studies', *J Intern Med*, 269: 107-17: 10.1111/j.1365-2796.2010.02281.x.
- Solvsten, C. A. E., F. de Paoli, J. H. Christensen, and A. L. Nielsen. 2018. 'Voluntary Physical Exercise Induces Expression and Epigenetic Remodeling of VegfA in the Rat Hippocampus', *Mol Neurobiol*, 55: 567-82: 10.1007/s12035-016-0344-y.
- Song, W., and X. A. Jin. 2015. 'Brain-derived neurotrophic factor inhibits neuromuscular junction maturation in a cAMP-PKA-dependent way', *Neurosci Lett*, 591: 8-12: 10.1016/j.neulet.2015.02.019.
- Soya, H., T. Nakamura, C. C. Deocaris, A. Kimpara, M. Imura, T. Fujikawa, H. Chang, B. S. McEwen, and T. Nishijima. 2007. 'BDNF induction with mild exercise in the rat hippocampus', *Biochem Biophys Res Commun*, 358: 961-7: 10.1016/j.bbrc.2007.04.173.
- Spedding, M., and P. Gressens. 2008. 'Neurotrophins and cytokines in neuronal plasticity', *Novartis Found Symp*, 289: 222-33; discussion 33-40
- Stoilov, P., E. Castren, and S. Stamm. 2002. 'Analysis of the human TrkB gene genomic organization reveals novel TrkB isoforms, unusual gene length, and splicing mechanism', *Biochem Biophys Res Commun*, 290: 1054-65: 10.1006/bbrc.2001.6301.
- Suire, C. N., E. Eitan, N. C. Shaffer, Q. Tian, S. Studenski, M. P. Mattson, and D. Kapogiannis. 2017. 'Walking speed decline in older adults is associated with elevated pro-BDNF in plasma extracellular vesicles', *Exp Gerontol*, 98: 209-16: 10.1016/j.exger.2017.08.024.
- Sumizono, M., H. Sakakima, S. Otsuka, T. Terashi, K. Nakanishi, K. Ueda, S. Takada, and K. Kikuchi. 2018. 'The effect of exercise frequency on neuropathic pain and pain-related

- cellular reactions in the spinal cord and midbrain in a rat sciatic nerve injury model', *J Pain Res*, 11: 281-91: 10.2147/JPR.S156326.
- Svedahl, K., and B. R. MacIntosh. 2003. 'Anaerobic threshold: the concept and methods of measurement', *Can J Appl Physiol*, 28: 299-323
- Swain, R. A., A. B. Harris, E. C. Wiener, M. V. Dutka, H. D. Morris, B. E. Theien, S. Konda, K. Engberg, P. C. Lauterbur, and W. T. Greenough. 2003. 'Prolonged exercise induces angiogenesis and increases cerebral blood volume in primary motor cortex of the rat', *Neuroscience*, 117: 1037-46
- Tabuchi, A., R. Nakaoka, K. Amano, M. Yukimine, T. Andoh, Y. Kuraishi, and M. Tsuda. 2000. 'Differential activation of brain-derived neurotrophic factor gene promoters I and III by Ca<sup>2+</sup> signals evoked via L-type voltage-dependent and N-methyl-D-aspartate receptor Ca<sup>2+</sup> channels', *J Biol Chem*, 275: 17269-75: 10.1074/jbc.M909538199.
- Tabuchi, A., H. Sakaya, T. Kisukeda, H. Fushiki, and M. Tsuda. 2002. 'Involvement of an upstream stimulatory factor as well as cAMP-responsive element-binding protein in the activation of brain-derived neurotrophic factor gene promoter I', *J Biol Chem*, 277: 35920-31: 10.1074/jbc.M204784200.
- TaheriChadorneshin, H., S. Cheragh-Birjandi, S. Ramezani, and S. H. Abtahi-Eivary. 2017. 'Comparing sprint and endurance training on anxiety, depression and its relation with brain-derived neurotrophic factor in rats', *Behav Brain Res*, 329: 1-5: 10.1016/j.bbr.2017.04.034.
- Takeda, K., P. Kermani, A. Anastasia, Y. Obinata, B. L. Hempstead, and H. Kurihara. 2013. 'BDNF protects human vascular endothelial cells from TNFalpha-induced apoptosis', *Biochem Cell Biol*, 91: 341-9: 10.1139/bcb-2013-0005.
- Takeda, K., Y. Obinata, A. Konishi, M. Kajiya, S. Matsuda, N. Mizuno, S. Sasaki, T. Fujita, and H. Kurihara. 2016. 'Brain-Derived Neurotrophic Factor Inhibits Intercellular Adhesion Molecule-1 Expression in Interleukin-1beta-Treated Endothelial Cells', *Cell Biochem Biophys*, 74: 399-406: 10.1007/s12013-016-0749-2.
- Takeo, C., S. Nakamura, T. Tanaka, D. Uchida, Y. Noguchi, T. Nagao, Y. Saito, and I. Tatsuno. 2003. 'Rat cerebral endothelial cells express trk C and are regulated by neurotrophin-3', *Biochem Biophys Res Commun*, 305: 400-6
- Tao, X., S. Finkbeiner, D. B. Arnold, A. J. Shaywitz, and M. E. Greenberg. 1998. 'Ca<sup>2+</sup> influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism', *Neuron*, 20: 709-26
- Tao, X., A. E. West, W. G. Chen, G. Corfas, and M. E. Greenberg. 2002. 'A calcium-responsive transcription factor, CaRF, that regulates neuronal activity-dependent expression of BDNF', *Neuron*, 33: 383-95
- Teng, H. K., K. K. Teng, R. Lee, S. Wright, S. Tevar, R. D. Almeida, P. Kermani, R. Torkin, Z. Y. Chen, F. S. Lee, R. T. Kraemer, A. Nykjaer, and B. L. Hempstead. 2005. 'ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin', *J Neurosci*, 25: 5455-63: 10.1523/JNEUROSCI.5123-04.2005.
- Teufel, A., N. Malik, M. Mukhopadhyay, and H. Westphal. 2002. 'Frcp1 and Frcp2, two novel fibronectin type III repeat containing genes', *Gene*, 297: 79-83: 10.1016/s0378-1119(02)00828-4.
- Tiano, J. P., D. A. Springer, and S. G. Rane. 2015. 'SMAD3 negatively regulates serum irisin and skeletal muscle FNDC5 and peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC-1alpha) during exercise', *J Biol Chem*, 290: 11431: 10.1074/jbc.A114.617399.

- Timmusk, T., N. Belluardo, M. Metsis, and H. Persson. 1993. 'Widespread and developmentally regulated expression of neurotrophin-4 mRNA in rat brain and peripheral tissues', *Eur J Neurosci*, 5: 605-13
- Timmusk, T., U. Lendahl, H. Funakoshi, E. Arenas, H. Persson, and M. Metsis. 1995. 'Identification of brain-derived neurotrophic factor promoter regions mediating tissue-specific, axotomy-, and neuronal activity-induced expression in transgenic mice', *J Cell Biol*, 128: 185-99: 10.1083/jcb.128.1.185.
- Timmusk, T., K. Palm, M. Metsis, T. Reintam, V. Paalme, M. Saarma, and H. Persson. 1993. 'Multiple promoters direct tissue-specific expression of the rat BDNF gene', *Neuron*, 10: 475-89
- Tiraby, C., and D. Langin. 2005. '[PGC-1alpha, a transcriptional coactivator involved in metabolism]', *Med Sci (Paris)*, 21: 49-54: 10.1051/medsci/200521149.
- Totoson, P., M. Pedard, C. Marie, and C. Demougeot. 2018. 'Activation of endothelial TrkB receptors induces relaxation of resistance arteries', *Vascul Pharmacol*, 106: 46-53: 10.1016/j.vph.2018.02.005.
- Tovar, Y. Romo L. B., U. N. Ramirez-Jarquín, R. Lazo-Gomez, and R. Tapia. 2014. 'Trophic factors as modulators of motor neuron physiology and survival: implications for ALS therapy', *Front Cell Neurosci*, 8: 61: 10.3389/fncel.2014.00061.
- Trang, T., S. Beggs, and M. W. Salter. 2011. 'Brain-derived neurotrophic factor from microglia: a molecular substrate for neuropathic pain', *Neuron Glia Biol*, 7: 99-108: 10.1017/S1740925X12000087.
- Tsai, S. F., Y. W. Liu, and Y. M. Kuo. 2019. 'Acute and long-term treadmill running differentially induce c-Fos expression in region- and time-dependent manners in mouse brain', *Brain Struct Funct*: 10.1007/s00429-019-01926-5.
- Tsuchida, A., T. Nonomura, T. Nakagawa, Y. Itakura, M. Ono-Kishino, M. Yamanaka, E. Sogawa, M. Taiji, and H. Noguchi. 2002. 'Brain-derived neurotrophic factor ameliorates lipid metabolism in diabetic mice', *Diabetes Obes Metab*, 4: 262-9
- Tsuchiya, Y., D. Ando, K. Goto, M. Kiuchi, M. Yamakita, and K. Koyama. 2014. 'High-intensity exercise causes greater irisin response compared with low-intensity exercise under similar energy consumption', *Tohoku J Exp Med*, 233: 135-40: 10.1620/tjem.233.135.
- Uchida, H., H. Yokoyama, H. Kimoto, H. Kato, and T. Araki. 2010. 'Long-term changes in the ipsilateral substantia nigra after transient focal cerebral ischaemia in rats', *Int J Exp Pathol*, 91: 256-66: 10.1111/j.1365-2613.2010.00712.x.
- van Praag, H., B. R. Christie, T. J. Sejnowski, and F. H. Gage. 1999. 'Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96: 13427-31
- van Praag, H., G. Kempermann, and F. H. Gage. 1999. 'Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus', *Nat Neurosci*, 2: 266-70: 10.1038/6368.
- Vaynman, S. S., Z. Ying, D. Yin, and F. Gomez-Pinilla. 2006. 'Exercise differentially regulates synaptic proteins associated to the function of BDNF', *Brain Res*, 1070: 124-30: 10.1016/j.brainres.2005.11.062.
- Vaynman, S., Z. Ying, and F. Gomez-Pinilla. 2003. 'Interplay between brain-derived neurotrophic factor and signal transduction modulators in the regulation of the effects of exercise on synaptic-plasticity', *Neuroscience*, 122: 647-57

- Vaynman, S., Z. Ying, and F. Gomez-Pinilla. 2004. 'Hippocampal BDNF mediates the efficacy of exercise on synaptic plasticity and cognition', *Eur J Neurosci*, 20: 2580-90: 10.1111/j.1460-9568.2004.03720.x.
- Ventriglia, M., L. Bocchio Chiavetto, L. Benussi, G. Binetti, O. Zanetti, M. A. Riva, and M. Gennarelli. 2002. 'Association between the BDNF 196 A/G polymorphism and sporadic Alzheimer's disease', *Mol Psychiatry*, 7: 136-7: 10.1038/sj.mp.4000952.
- Vignoli, B., G. Battistini, R. Melani, R. Blum, S. Santi, N. Berardi, and M. Canossa. 2016. 'Peri-Synaptic Glia Recycles Brain-Derived Neurotrophic Factor for LTP Stabilization and Memory Retention', *Neuron*, 92: 873-87: 10.1016/j.neuron.2016.09.031.
- Vivar, C., M. C. Potter, and H. van Praag. 2013. 'All about running: synaptic plasticity, growth factors and adult hippocampal neurogenesis', *Curr Top Behav Neurosci*, 15: 189-210: 10.1007/7854\_2012\_220.
- Wang, L., Z. Lv, Z. Hu, J. Sheng, B. Hui, J. Sun, and L. Ma. 2010. 'Chronic cocaine-induced H3 acetylation and transcriptional activation of CaMKIIalpha in the nucleus accumbens is critical for motivation for drug reinforcement', *Neuropsychopharmacology*, 35: 913-28: 10.1038/npp.2009.193.
- Wang, L. N., J. P. Yang, F. H. Ji, Y. Zhan, X. H. Jin, Q. N. Xu, X. Y. Wang, and J. L. Zuo. 2012. 'Brain-derived neurotrophic factor modulates N-methyl-D-aspartate receptor activation in a rat model of cancer-induced bone pain', *J Neurosci Res*, 90: 1249-60: 10.1002/jnr.22815.
- Wang, X. Q., and G. W. Wang. 2016. 'Effects of treadmill exercise intensity on spatial working memory and long-term memory in rats', *Life Sci*, 149: 96-103: 10.1016/j.lfs.2016.02.070.
- Wells, D. G., B. A. McKechnie, S. Kelkar, and J. R. Fallon. 1999. 'Neurotrophins regulate agrin-induced postsynaptic differentiation', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96: 1112-7: 10.1073/pnas.96.3.1112.
- West, A. E., W. G. Chen, M. B. Dalva, R. E. Dolmetsch, J. M. Kornhauser, A. J. Shaywitz, M. A. Takasu, X. Tao, and M. E. Greenberg. 2001. 'Calcium regulation of neuronal gene expression', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 11024-31: 10.1073/pnas.191352298.
- Wetmore, C., P. Ernfors, H. Persson, and L. Olson. 1990. 'Localization of brain-derived neurotrophic factor mRNA to neurons in the brain by in situ hybridization', *Exp Neurol*, 109: 141-52: 10.1016/0014-4886(90)90068-4.
- Wiedemann, F. R., D. Siemen, C. Mawrin, T. F. Horn, and K. Dietzmann. 2006. 'The neurotrophin receptor TrkB is colocalized to mitochondrial membranes', *Int J Biochem Cell Biol*, 38: 610-20: 10.1016/j.biocel.2005.10.024.
- Wong, J., and B. Garner. 2012. 'Evidence that truncated TrkB isoform, TrkB-Shc can regulate phosphorylated TrkB protein levels', *Biochem Biophys Res Commun*, 420: 331-5: 10.1016/j.bbrc.2012.02.159.
- Woo, N. H., H. K. Teng, C. J. Siao, C. Chiaruttini, P. T. Pang, T. A. Milner, B. L. Hempstead, and B. Lu. 2005. 'Activation of p75NTR by proBDNF facilitates hippocampal long-term depression', *Nat Neurosci*, 8: 1069-77: 10.1038/nn1510.
- Wrann, C. D. 2015. 'FNDC5/irisin - their role in the nervous system and as a mediator for beneficial effects of exercise on the brain', *Brain Plast*, 1: 55-61: 10.3233/BPL-150019.
- Wrann, C. D., J. P. White, J. Salogiannis, D. Laznik-Bogoslavski, J. Wu, D. Ma, J. D. Lin, M. E. Greenberg, and B. M. Spiegelman. 2013. 'Exercise induces hippocampal BDNF through a PGC-1alpha/FNDC5 pathway', *Cell Metab*, 18: 649-59: 10.1016/j.cmet.2013.09.008.

- Xu, K., J. C. Lamanna, and M. A. Puchowicz. 2012. 'Neuroprotective properties of ketone bodies', *Adv Exp Med Biol*, 737: 97-102: 10.1007/978-1-4614-1566-4\_15.
- Xu, Q., Y. Park, X. Huang, A. Hollenbeck, A. Blair, A. Schatzkin, and H. Chen. 2010. 'Physical activities and future risk of Parkinson disease', *Neurology*, 75: 341-8: 10.1212/WNL.0b013e3181ea1597.
- Yamamoto, H., and M. E. Gurney. 1990. 'Human platelets contain brain-derived neurotrophic factor', *J Neurosci*, 10: 3469-78
- Yamamoto, M., G. Sobue, K. Yamamoto, S. Terao, and T. Mitsuma. 1996. 'Expression of mRNAs for neurotrophic factors (NGF, BDNF, NT-3, and GDNF) and their receptors (p75NGFR, trkA, trkB, and trkC) in the adult human peripheral nervous system and nonneural tissues', *Neurochem Res*, 21: 929-38
- Yan, Q., M. J. Radeke, C. R. Matheson, J. Talvenheimo, A. A. Welcher, and S. C. Feinstein. 1997. 'Immunocytochemical localization of TrkB in the central nervous system of the adult rat', *J Comp Neurol*, 378: 135-57
- Yan, Q., R. D. Rosenfeld, C. R. Matheson, N. Hawkins, O. T. Lopez, L. Bennett, and A. A. Welcher. 1997. 'Expression of brain-derived neurotrophic factor protein in the adult rat central nervous system', *Neuroscience*, 78: 431-48: 10.1016/s0306-4522(96)00613-6.
- Yang, J., L. C. Harte-Hargrove, C. J. Siao, T. Marinic, R. Clarke, Q. Ma, D. Jing, J. J. Lafrancois, K. G. Bath, W. Mark, D. Ballon, F. S. Lee, H. E. Scharfman, and B. L. Hempstead. 2014. 'proBDNF negatively regulates neuronal remodeling, synaptic transmission, and synaptic plasticity in hippocampus', *Cell Rep*, 7: 796-806: 10.1016/j.celrep.2014.03.040.
- Yin, H., F. Price, and M. A. Rudnicki. 2013. 'Satellite cells and the muscle stem cell niche', *Physiol Rev*, 93: 23-67: 10.1152/physrev.00043.2011.
- Youssef, M. M., M. D. Underwood, Y. Y. Huang, S. C. Hsiung, Y. Liu, N. R. Simpson, M. J. Bakalian, G. B. Rosoklija, A. J. Dwork, V. Arango, and J. J. Mann. 2018. 'Association of BDNF Val66Met Polymorphism and Brain BDNF Levels with Major Depression and Suicide', *Int J Neuropsychopharmacol*, 21: 528-38: 10.1093/ijnp/pyy008.
- Yu, T., Y. Chang, X. L. Gao, H. Li, and P. Zhao. 2017. 'Dynamic Expression and the Role of BDNF in Exercise-induced Skeletal Muscle Regeneration', *Int J Sports Med*, 38: 959-66: 10.1055/s-0043-118343.
- Zafra, F., B. Hengerer, J. Leibrock, H. Thoenen, and D. Lindholm. 1990. 'Activity dependent regulation of BDNF and NGF mRNAs in the rat hippocampus is mediated by non-NMDA glutamate receptors', *EMBO J*, 9: 3545-50
- Zhao, Z., A. R. Nelson, C. Betsholtz, and B. V. Zlokovic. 2015. 'Establishment and Dysfunction of the Blood-Brain Barrier', *Cell*, 163: 1064-78: 10.1016/j.cell.2015.10.067.
- Zheng, F., X. Zhou, Y. Luo, H. Xiao, G. Wayman, and H. Wang. 2011. 'Regulation of brain-derived neurotrophic factor exon IV transcription through calcium responsive elements in cortical neurons', *PLoS One*, 6: e28441: 10.1371/journal.pone.0028441.
- Zhou, X. F., L. F. Parada, D. Soppet, and R. A. Rush. 1993. 'Distribution of trkB tyrosine kinase immunoreactivity in the rat central nervous system', *Brain Res*, 622: 63-70: 10.1016/0006-8993(93)90802-t.
- Zoladz, J. A., and A. Pilc. 2010. 'The effect of physical activity on the brain derived neurotrophic factor: from animal to human studies', *J Physiol Pharmacol*, 61: 533-41

**Titre:** Impact des modalités d'un exercice physique sur la neuroplasticité. Focus sur les sources de BDNF

**Mots clés:** BDNF, exercice physique, endothélium, muscle, neuroplasticité

**Résumé:** L'exercice physique (EX) est reconnu comme la stratégie non pharmacologique la plus efficace pour améliorer la santé cérébrale. Les études menées chez l'Homme et l'animal s'accordent pour impliquer le brain-derived neurotrophic factor (BDNF), une neurotrophine dont les taux cérébraux augmentent en réponse à l'EX et qui est unanimement reconnue comme une molécule de signalisation cruciale de la neuroplasticité. Principalement exprimé par les neurones, le BDNF est également très exprimé par la cellule endothéliale et la cellule musculaire. Très largement sollicités lors d'un effort physique, l'endothélium et le muscle pourraient intervenir dans les effets positifs induits par l'EX. Bien qu'il existe aujourd'hui un consensus sur l'implication du BDNF dans les effets cérébraux de l'EX, il n'en existe pas concernant les modalités d'EX à pratiquer pour optimiser de manière efficace la plasticité cérébrale. Dans ce contexte, les objectifs de ces travaux étaient de déterminer l'impact des modalités de l'EX sur les expressions protéiques de BDNF dans différents territoires (cerveau, endothélium, muscle) et d'étudier les mécanismes à l'origine de l'augmentation de BDNF en réponse à l'EX.

Nos résultats montrent que 1) l'expression du BDNF dans des vaisseaux périphériques de même territoire vasculaire (diamètre interne différent) est similaire en réponse à l'EX et majoritairement d'origine endothéliale, 2) l'augmentation de l'expression cérébrale de BDNF en réponse à l'EX dépend de l'intensité de l'EX, mais pas du type de contraction (excentrique/concentrique), 3) la mémoire est restaurée par un EX de forte intensité, 4) l'EX n'impacte pas l'expression musculaire de BDNF, mais augmente l'expression du précurseur de l'irisine (FNDC5), 5) l'expression du BDNF dépend de la composition du muscle en fibres musculaires, 6) les effets cérébraux de l'intensité de l'EX ne semblent pas être reliés à la surexpression de l'irisine musculaire. En conclusion, nos données démontrent que l'EX impacte positivement l'expression endothéliale, cérébrale mais pas musculaire de BDNF. Les résultats mettent en évidence l'importance du paramètre intensité de l'EX sur les taux cérébraux de BDNF. Enfin, selon nos données obtenues, l'irisine et le BDNF musculaires ne semblent pas être impliqués dans l'augmentation cérébrale de BDNF en fonction de l'intensité de l'EX.

**Title:** Impact of physical exercise modalities on neuroplasticity. Focus on BDNF sources

**Keywords:** BDNF, physical exercise, endothelium, muscle, neuroplasticity

**Abstract:** Physical exercise (EX) is recognized as the most potent non-pharmacological strategy to positively enhance brain health. From Human and animal studies there is a consensus to involve brain-derived neurotrophic factor (BDNF), a neurotrophin strongly expressed in response to EX and implicated in neuroplasticity mechanisms. Mainly expressed by neurons, BDNF is also expressed by endothelial and muscle cells. Largely sought during a physical effort, endothelium and skeletal muscle could be involved in positive effects induced by EX. Although there is a real consensus about BDNF and cerebral effect of EX, the typology of the better regimen of EX to enhance cerebral plasticity is not known. In this context, objectives of this works were to determine the impact of EX modalities on BDNF protein expression in different territory (brain, endothelium and muscle) and to identify mechanisms related in BDNF increases in response to EX. Our results showed that

1) BDNF expression in peripheral vessels from the same vascular territory (distinct internal diameter) is similar in response to EX, 2) cerebral BDNF increases induced by EX is dependent on EX intensity but not on the type of contraction (eccentric/concentric), 3) memory is restored by high intensity EX, 4) after EX, BDNF muscular expression is unchanged while the precursor of irisine (FNDC5) expression is increased, 5) BDNF expression depends on muscular fibers typology, 6) cerebral beneficial effects of EX intensity is might not be related to muscular irisine production. In conclusion, our data demonstrated that EX positively impact endothelial, cerebral but not muscular BDNF expression. Results highlighted the importance of the intensity parameter of EX on cerebral BDNF levels. Finally, according to our data, irisine and BDNF from the muscle might not be related to the cerebral increases of BDNF induced by EX intensity