

N° ordre : 3807

# THÈSE

PRÉSENTÉE A

**L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 1**  
ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Par

**Madame Nadirah GHENIMI RAHAB**

POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR**

SPÉCIALITÉ : NUTRITION

**ACTION DES RETINOÏDES ET  
PROCESSUS NEURODEGENERATIFS  
ASSOCIES A LA MALADIE D'ALZHEIMER**

Soutenue le : 18 juin 2009

Devant la commission d'examen formée de :

M. BOREL Patrick	Directeur de Recherche INRA, Marseille	<b>Président du Jury</b>
M.COZZONE Patrick	Professeur, CNRS, Marseille	<b>Rapporteur</b>
M. BUEE Luc	Directeur de Recherche CNRS, Lille	<b>Rapporteur</b>
Mme PALLET Véronique	Professeur, Université Bordeaux1	<b>Examineur</b>
M. GALLIS Jean Louis	Chargé de Recherche 1, CNRS, Bordeaux	<b>Examineur</b>
Melle ENDERLIN Valérie	MCU, Université Bordeaux1	<b>Directeur de thèse</b>



# AVANT PROPOS

Cette thèse de doctorat a été effectuée au sein de l'Unité de Nutrition et Neurosciences dirigée par le Pr Higuieret en collaboration avec le Laboratoire de Résonance Magnétique des Systèmes Biologiques de l'UMR 5536 CNRS. Elle a été financée par une bourse MENRT.

Les résultats de ce travail ont donné lieu aux publications et aux communications suivantes :

## PUBLICATIONS

**Publication N° 1:** Vitamin A deficiency in rats induces anatomic and metabolic changes comparable with those of neurodegenerative disorders. Ghenimi N, Beauvieux MC, Biran M, Pallet V, Higuieret P, Gallis JL. *J Nutr.* 2009 Apr;139(4):696-702.

**Publication N° 2:** Retinoic acid normalizes nuclear receptor mediated hypo-expression of proteins involved in beta-amyloid deposits in the cerebral cortex of vitamin A deprived rats. Husson M, Enderlin V, Delacourte A, Ghenimi N, Alfos S, Pallet V, Higuieret P. *Neurobiol Dis.* 2006 Jul;23(1):1-10.

**Publication N° 3:** Vitamin A hyposignalling modulates APP degrading processing. Ghenimi N, Enderlin V, Troquier L, Redonnet A, Gallis JL, Beauvieux MC, Higuieret P, Pallet V. En préparation pour *Neurobiology of aging*.

**Publication N°4:** Hypothyroidism induced by PTU treatment activates amyloidogenic pathway in rats. Ghenimi N, Troquier L, Redonnet A, Gallis JL, Beauvieux MC, Higuieret P, Pallet V, Enderlin V En préparation pour *Neurobiology of disease*.

## COMMUNICATIONS DANS DES CONGRES A COMITE DE LECTURE

### COMMUNICATIONS ORALES

- Rétinoïdes et maladie d'Alzheimer: atrophie cérébrale chez le rat carencé en vitamine A mise en évidence par imagerie de résonance magnétique. Nadirah Ghenimi, MC Beauvieux, M Biran, P Higuieret, JL Gallis. 2° Congrès de la Société Française de Nutrition, 17-19 novembre 2005, Marseille
- Implication des rétinoïdes dans le vieillissement cérébral: étude par imagerie et spectroscopie RMN chez la souris âgée. Nadirah Ghenimi, MC Beauvieux, M Biran, P Higuieret, JL Gallis. 2° Congrès de la Société Française de Nutrition, 17-19 novembre 2005, Marseille

### COMMUNICATIONS AFFICHEES

- Is there a benefic effect of retinoic acid on cortical N Acetyl aspartate and Glutathione in Vitamin A deprived rat? Proton HRMAS NMR spectroscopy study. N Ghenimi Rahab,

MC Beauvieux, V Enderlin, P Higuieret, JL Gallis. Colloque Franco-Québécois organisé par la Région Aquitaine, 2 Juillet 2009, Bordeaux

- Is there a benefic effect of retinoic acid on cortical N Acetyl aspartate and Glutathione in Vitamin A deprived rat? proton HRMAS NMR spectroscopy study. N Ghenimi Rahab, MC Beauvieux, V Enderlin, P Higuieret, JL Gallis. 9° Colloque de la Société des Neurosciences, 26-29 mai 2009, Bordeaux
- Changements anatomiques et métaboliques associés à la maladie d'Alzheimer mis en évidence par IRM et SRM chez des rats carencés en vitamine A. N Ghenimi, MC Beauvieux, P Higuieret, V Enderlin, V Pallet, JL Gallis. 9° réunion francophone sur la maladie d'Alzheimer et les syndromes apparentés. 20-22 novembre 2007, Nice. *Revue Neurologique* 2007, 163(11)C2.
- La carence en vitamine A induit des changements anatomiques et métaboliques observés dans la maladie d'Alzheimer. N Rahab Ghenimi, Y Zengin, M Biran, F Sall, MC Beauvieux, P Higuieret, V Pallet, JL Gallis. XX °Congrès du GERM, 25-30 mars 2007, Alénia
- Magnetic Resonance Imaging visualisation of Alzheimer amyloid plaques without contrast agent in transgenic mice. Ghenimi Rahab N, Zengin Y, Franconi JM, Blanchard J, Raffard G, Beauvieux MC, Higuieret P, Pallet V, Gallis JL.. 2° Congrès International Santé et Nutrition Vitagora, 8-10 mars 2007, Dijon.
- La carence en vitamine A induit des changements anatomiques et métaboliques associés à la maladie d'Alzheimer. Rahab Ghenimi N, Sall F, Beauvieux MC, Higuieret P, Pallet V, Gallis JL. 6° Journées Francophones de Nutrition JFN, 29 nov-2 déc 2006, Nice, *Nutr Clin Métab* 2006, 20, S124
- Increase in creatine content in rat brain with ageing. F Sall, N Ghenimi Rahab, E Bezançon, MC Beauvieux, JL Gallis. 23th Annual Scientific Meeting of ESMRMB, Sept 21-23 2006, Varsovie Pologne. *Magn Res Mat Phys Biol* 2006, 19.
- Vitamin A deficiency reveals anatomic and metabolic changes known to be associated with Alzheimer disease. Ghenimi Rahab N, Sall F, Biran M, Pallet V, Higuieret P, Beauvieux MC, Gallis JL. 23th Annual Scientific Meeting of ESMRMB, Sept 21-23 2006, Varsovie Pologne. *Magn Res Mat Phys Biol* 2006, 19.
- Increase of acetate and choline cerebral content related to brain atrophy induced by vitamin A deficiency in rat. F Sall, N Ghenimi, E Bezançon, M Biran, V Pallet, MC Beauvieux, P Higuieret, JL Gallis. French-Benelux Meeting of Magnetic Resonance, GERM, 19-22 march 2006, Blankenberge, Belgium
- Implication des rétinoïdes au cours du vieillissement cérébral : approches par Résonance Magnétique Nucléaire. Rahab Ghenimi N, Sall F, Biran M, Beauvieux MC, Pallet V, Higuieret P, Gallis JL. 1° congrès international Vitagora Santé et Nutrition, 2-4 mars 2006 Dijon
- Vitamin A deprivation in the rat induces a decrease in cerebral volume and a change in creatine-phosphocreatine brain content. N Rahab Ghenimi, M Biran, MC Beauvieux, K Belbachir, P Higuieret, JL Gallis. 22<sup>nd</sup> Annual Scientific Meeting of ESMRMB, 15-18 september 2005, Bâle, Suisse
- Approches de spectroimagerie in vivo: rôle de la vitamine A dans le vieillissement cérébral. N Rahab Ghenimi, M Biran, MC Beauvieux, P Higuieret, JL Gallis. Réunion du GERM, 4-7 avril 2005, Carry le Rouet

## REMERCIEMENTS

Je tenais tout d'abord à remercier le Pr Paul Higuieret et le Pr Jean Michel Franconi de m'avoir accueilli au sein de leurs laboratoires respectifs, l'Unité de Nutrition et Neurosciences et le Laboratoire de Résonance Magnétique des Systèmes Biologiques UMR 5536, pour leur confiance ainsi que pour les précieux moments scientifiques qu'ils ont pu m'accorder.

Je remercie également les membres du Jury le Pr Cozzone, le Dr Luc Buée ainsi que le Pr Borel d'avoir accepté d'évaluer ce travail malgré leur emploi du temps surchargé.

Cette thèse a fait suite aux travaux réalisés au cours de mon Master 2 dans l'UMR 5536 sous la direction de Jean-Louis Gallis. Pour la petite histoire, au départ de ce travail, il existait peu de publications traitant du sujet « rétinoïdes et Maladie d'Alzheimer ». Ce sujet était donc à la fois excitant mais également déroutant par son originalité. Jean-Louis Gallis a su en prendre le pari et m'a encadré pour toute la partie RMN. J'ai ainsi pu découvrir un homme doté d'une incroyable énergie, au cerveau en constante ébullition avec une soif de savoir constante : bref « le vrai chercheur ». Son accompagnement pédagogique atypique et son respect de l'individu encourage l'étudiant à développer ses capacités et à les mettre en valeur. Cela a été un enrichissement humain inestimable.

Je remercie également Marie-Christine Beauvieux pour sa force de travail et ses longues soirées passées derrière le net à travailler ensemble. J'ai appris avec elle ce qu'étaient les valeurs de persévérance et de confiance. J'espère que l'on continuera à travailler ensemble.

Par ailleurs, l'interface physique-biologie développée dans l'UMR a été d'une grande richesse pour moi. J'ai ainsi pu bénéficier des compétences techniques des ingénieurs Gérard Raffard, Marc Biran et Eric Besancon qui ont su être présents et qui m'ont accompagné dans toutes les difficultés que présentaient les aimants pour une biologiste, du 11,7T au 4.7T, de l'imagerie à l'HRMAS. Merci encore pour votre patience ! Je remercie également profondément toutes les personnes du RMSB, Michèle, Anne-Karine, Gisèle, Emeline, Fabienne, Marie-Jo... pour leur gentillesse et leur soutien lors de l'arrivée du petit Adam.

Concernant la partie biologie cellulaire et moléculaire, elle a été réalisée dans un premier temps sous la direction de Véronique Pallet puis de Valérie Enderlin au sein de l'Unité de Nutrition et Neurosciences.

Merci à Véronique Pallet pour son encadrement, ses discussions scientifiques enrichissantes ainsi que pour son respect et sa confiance.

Merci à Valérie Enderlin pour son accompagnement scientifique, pour la mise en place des nouvelles manipulations au laboratoire allant du Western Blot à l'activité enzymatique en passant par l'Elisa. Merci pour son rôle majeur dans le travail de correction du manuscrit

de thèse, dans l'écriture des publications ainsi que pour le temps accordé pour la préparation de l'oral. Grâce à elle, j'ai ainsi pu acquérir ces différentes techniques et je l'en remercie.

Merci à Anabelle Redonnet pour m'avoir formé en PCR et pour sa gentillesse. Merci à Serge Alfos pour sa présence technique tout au long de cette thèse qui a été précieuse.

Bien sûr, tout cela n'aurait pas pu être réalisé sans le soutien de ma famille. Merci à mes parents Abdelhafid et Nedjema Ghenimi, un homme et une femme dotés de grandes valeurs morales qui m'ont toujours poussé à étudier, et à qui je dédie ce travail.

Merci à mon mari Fathi pour son soutien inestimable, sa patience et son réconfort dans les moments difficiles et surtout pour avoir su gérer notre fils tous les moments où je ne le pouvais pas.

Merci à Adam pour la force que tu m'as donné.

# RESUME DES TRAVAUX DE THESE

## **TITRE : Action des rétinoïdes et processus neurodégénératifs associés à la maladie d'Alzheimer**

Un ensemble des données cohérentes de la littérature plaide en faveur d'une relation entre une baisse d'activité de la voie de signalisation de la vitamine A, des altérations de la plasticité synaptique et des déficits mnésiques spécifiques associés au vieillissement. Une diminution de l'activité de cette voie de signalisation est également évoquée dans les processus neurodégénératifs caractéristiques de la maladie d'Alzheimer.

Dans ce contexte, les objectifs de ce travail étaient de mieux comprendre les conséquences neuro-anatomiques et fonctionnelles d'une baisse d'activité de la voie de signalisation de la vitamine A. Notre approche expérimentale a mis en œuvre 2 modèles animaux, un modèle de carence vitaminiqve A qui induit spécifiquement une baisse d'activité de sa voie de signalisation et un modèle d'hypothyroïdie dont il a été montré qu'il induit aussi une hypoactivité de la voie de signalisation de la vitamine A.

La démarche expérimentale conduite chez les rats carencés en vitamine A comporte deux volets : (i) un volet mettant en œuvre l'imagerie et la spectroscopie RMN, (ii) un volet moléculaire consacrée à l'étude de l'expression de gènes cibles des rétinoïdes impliqués dans le processus amyloïdogène. Les mesures ont été réalisées, d'une part, chez des animaux soumis à un régime dépourvu en vitamine A pendant 10 semaines et d'autre part, chez des animaux soumis à ce même régime pendant une durée de 13 ou 14 semaines. Une partie des animaux carencés a été traitée par de l'AR.

Les résultats montrent que dès 10 semaines de carence, les animaux présentent une altération du métabolisme et de son action cellulaire de la vitamine A qui se traduit par (i) une diminution significative du taux de vitamine A sérique, (ii) une diminution du taux d'ARNm codant pour les récepteurs RAR, dans le cerveau entier, le striatum, l'hippocampe et de manière moins prononcée le cortex des animaux. Après 10 semaines de régime dépourvu en vitamine A, des modifications métaboliques ont été mises en évidence essentiellement dans le cortex. Elles se traduisent par une hausse du (i) NAA/Cr, marqueur de la densité neuronale corrigée par une administration d'AR, et (ii) du GSH/Cr, indicateur du potentiel antioxydant cellulaire dans cette structure. Au plan anatomique, un ralentissement de la croissance cérébrale a été observé dès la 7<sup>ème</sup> semaine de régime. Une diminution du volume hippocampique et une augmentation des espaces ventriculaires ont été observées à partir de 11 semaines de carence. Au plan moléculaire, aucune modification de l'expression du gène codant pour APP, ou du rapport APP770-751/APP695, considéré comme un indicateur précoce de la MA n'a été observée après 10 semaines de carence.

Après 14 semaines de régime dépourvu en vitamine A, de profondes modifications métaboliques sont observées dans les trois structures à savoir le cortex, l'hippocampe et le striatum. Au plan moléculaire, les principaux résultats suggèrent un basculement du processus biochimique de dégradation de la protéine APP en faveur de la

voie amyloïdogénique dans le cortex, et par voie de conséquence en faveur de la formation du peptide A $\beta$ . Cependant, aucune modification du taux protéique des peptides A $\beta$  n'a été mise en évidence dans le cortex et l'hippocampe des rats carencés.

Le modèle d'hypothyroïdie que nous avons mis en oeuvre entraîne bien une hypoactivité de la voie de signalisation de la T3, observée dans l'hippocampe des animaux et une diminution du taux d'ARNm codant pour RAR $\beta$  observée dans le cortex des rats hypothyroïdiens. Au plan moléculaire, l'augmentation du rapport APP770-751/APP695 a été observée chez les rats rendus hypothyroïdiens par rapport aux rats témoins. Comme chez les rats carencés en vitamine A, les indicateurs de la voie physiologique ne sont que très faiblement affectés chez les rats rendus hypothyroïdiens. Les modifications de la voie amyloïdogénique sont, en revanche, beaucoup plus importantes que celles observées chez les animaux carencés. Parmi elles, on peut retenir l'augmentation significative des activités de la  $\beta$ - et  $\gamma$ -sécrétase dans les deux structures étudiées, associée à l'augmentation du taux de peptides A $\beta$ .

*L'ensemble de ces données met en évidence que l'hypoactivité de la voie de l'AR, générée par une carence vitaminique A d'une durée de 13 à 14 semaines génère un ensemble de modifications qui peuvent être comparées à celles observées dans la maladie d'Alzheimer. Ces modifications renforcent l'idée d'une implication de l'hypoactivité de la voie de l'AR dans les processus mis en place dans cette maladie. Cependant, dans nos conditions expérimentales, le modèle de carence ne permet pas de générer une augmentation du taux de peptide A $\beta$  à l'origine de la formation des dépôts amyloïdes. Les modifications observées dans ce modèle expérimental sont plus nombreuses que celles observées après 10 semaines de régime mais restent encore des modifications qui évoquent les phases précoces de la maladie.*

*Par ailleurs, l'hypothyroïdie, dont la prévalence augmente avec l'âge, génère des atteintes moléculaires caractéristiques du processus de dégradation de la protéine APP, qui conduisent à une augmentation des peptides A $\beta$ , dans l'hippocampe, structure très vulnérable dans la MA. Ces données suggèrent que ce modèle physiologique d'hypothyroïdie, basé sur des modifications hormonales proches de celles observées au cours du vieillissement, pourrait générer le développement physiopathologique de certains processus participant à l'étiologie de la MA.*

---

**MOTS CLES :** Acide rétinoïque, Carence en vitamine A, hypothyroïdie, maladie d'Alzheimer, IRM, HRMAS, amyloïdogénèse, APP, peptide Abeta.



# ABSTRACT

**TITLE : Retinoid signalling and neurodegenerative disorders associated with Alzheimer disease**

Some data reveal that retinoid hyposignalling, presumably resulting from decreased bioavailability of retinoid ligands naturally, was shown to result in aging-related synaptic plasticity and long term potentiation (LTP) alterations as well as in aging-related decline of cognitive function. Moreover, genetic, metabolic and dietary evidence has been provided for a defective retinoid metabolism in Alzheimer disease (AD). Thus, key steps of the amyloid production process are under the control of proteins whose expression is positively regulated by RA *in vitro*.

In this context, the aims of this work were to better understand neuro-anatomical and functional consequences of retinoid signaling brain hypoactivity. Our experimental method uses two animal models: a Vitamin A deficiency model which induce especially an hypoactivity of retinoid pathway, and an hypothyroid model which was also characterized by an hypoactivity of retinoid pathway.

In the first model, two main approaches were used : (i) an NMR imaging and spectroscopy approach, (ii) a molecular approach to study expression of retinoid target genes implicated in amyloidogenic process. NMR results showed that VAD induces severe anatomic and metabolic disorders in particular a slowing of brain growth, hippocampus atrophy, and a decrease of NAA/Cr, marker of neuronal density which was observed in cortex, hippocampus and striatum. Molecular results reveal a vitamin A deficiency-related dysregulation of the amyloid pathway in the cortex of rats, which is known to be the first brain area altered by AD development. In this area, 14 weeks of deprived diet induces physiological dysregulation in the modulation of RA target genes leading to an increased amount of ADAM10, BACE and PS1, with some modifications in amyloidogenic pathway but without increased amount of A $\beta$  peptides.

In hypothyroid model, molecular results suggests that adult onset-hypothyroidism may induce the amyloidogenic pathway of APP processing by increasing activity of  $\beta$  and  $\gamma$ secretases and levels of amyloid peptides mainly in hippocampus.

*Together these data argue for the idea that hypoactivity of retinoid signalling which occurs naturally with aging could be a factor participating in accelerating aging and that hypothyroidism that become more prevalent with advancing age, could increase, via a hyposignaling of T3 pathway, the vulnerability of amyloidogenic pathway of APP processing as well as of other clinical symptoms of AD.*

---

**KEY WORDS:** Retinoic Acid, Vitamin A deficiency, hypothyroidism, Alzheimer disease, MRI, HRMAS, APP, amyloidogenic pathway.



# SOMMAIRE

Liste des figures .....	1
Liste des tableaux .....	2
Liste des abréviations.....	3
Introduction.....	5

<h2>CHAPITRE I</h2> <h3>DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES</h3>
---

<b>I La vitamine A et le système nerveux central .....</b>	<b>7</b>
<b>1. Généralités sur la vitamine A.....</b>	<b>7</b>
<u>1.1 Définition.....</u>	7
<u>1.2 Sources alimentaires et recommandations.....</u>	8
<b>2. Métabolisme général de la vitamine A.....</b>	<b>11</b>
<u>2.1 De la lumière intestinale à la cellule cible.....</u>	12
<u>2.2 Devenir du rétinol dans la cellule cible.....</u>	12
<u>2.3 Transport et métabolisme cérébral de la vitamine A.....</u>	13
<b>3. Mode d'action de l'acide rétinoïque, métabolite actif de la vitamine A.....</b>	<b>15</b>
<u>3.1 La superfamille des récepteurs nucléaires.....</u>	15
3.1.1 <i>Structure.....</i>	15
3.1.2 <i>Les éléments de réponse.....</i>	17
<u>3.2 Les récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque.....</u>	19
3.2.1 <i>Les différents récepteurs.....</i>	19
3.2.2 <i>Régulation de la voie d'action.....</i>	20
3.2.3 <i>Hétérodimérisation.....</i>	20
3.2.4 <i>Distribution tissulaire et cérébrale des récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque.....</i>	20
<u>3.3 Quelques gènes cibles des rétinoïdes.....</u>	21

<b>II Vitamine A et vieillissement .....</b>	<b>23</b>
1. Hypoactivité de la voie de signalisation des rétinoïdes au cours de l'âge.....	23
2. Conséquences fonctionnelles sur la plasticité synaptique et la mémoire.....	24
3. Modèle nutritionnel de carence vitaminique A.....	25
<u>3.1 Conséquences fonctionnelles sur la plasticité cérébrale et la</u>	
<u>mémoire.....</u>	25

### **III Rétinoïdes et processus neurodégénératifs : liens avec la MA.**

<b>1. La maladie d'Alzheimer (MA).....</b>	<b>27</b>
<u>1.1 Données épidémiologiques.....</u>	27
<u>1.2 Facteurs génétiques et environnementaux.....</u>	27
<i>1.2.1 Les formes monogéniques à transmission mendélienne autosomique</i>	
<i>dominante.....</i>	28
<i>1.2.2 Les forme sporadiques.....</i>	28
<u>1.3 Les anomalies morphologiques .....</u>	30
1.3.1 Les plaques amyloïdes.....	30
1.3.2 Les dégénérescences neurofibrillaires.....	33
1.3.3 Rapports chronologiques entre plaques amyloïdes et DNF.....	37
1.3.4 L'atrophie cérébrale.....	38
<u>1.4 Les symptômes, diagnostic et stades de la MA.....</u>	38
<u>1.5 Les modèles d'études (et leurs limites).....</u>	39
<b>2. Hypofonctionnement de la voie des rétinoïdes et Maladie d'Alzheimer.....</b>	<b>40</b>
<u>2.1 Données épidémiologiques.....</u>	40
<u>2.2 Données génétiques.....</u>	40
<u>2.3 Données cellulaires et moléculaires .....</u>	41
2.3.1 Vitamine A et voie amyloïdogénique.....	41
2.3.2 Vitamine A et dégénérescences neurofibrillaires.....	42
2.3.3 Protéines de liaison du rétinol associées à la MA.....	42

IV Objectifs du travail.....	45
------------------------------	----

<p style="text-align: center;"><b>CHAPITRE II</b> <b>ETUDE DE L'ANATOMIE ET DU METABOLISME</b> <b>CEREBRAL PAR RMN CHEZ LE RAT CARENCE EN</b> <b>VITAMINE A</b></p>
---

<b>1. Résonance magnétique nucléaire ou RMN.....</b>	<b>47</b>
<u>1.1 Les Bases de la RMN.....</u>	47
<u>1.2 Les techniques RMN : l'imagerie et la</u>	
<u>spectrométrie.....</u>	<b>49</b>
<b>2. Effets d'une carence en vitamine A sur l'anatomie et le métabolisme cérébral</b>	
<b>chez le rat : approches par IRM et HRMAS.....</b>	<b>52</b>
<u>2.1 Méthodologie.....</u>	52
<u>2.2 Principaux résultats.....</u>	52
<u>2.3 Conclusion.....</u>	53

<b>Publication n°1 :</b>	<b>54</b>
<u>Vitamin A deficiency in rats induces anatomic and metabolic changes comparable with those of neurodegenerative disorders.</u> Ghenimi N, Beauvieux MC, Biran M, Pallet V, Higuere P, Gallis JL. <i>J Nutr.</i> 2009 Apr; <b>139(4):696-702.</b>	

<b>3- Effets d'une administration d'AR sur le métabolisme cérébral chez le rat</b>	
<b>carencé en vitamine A : étude par HRMAS du 1H.....</b>	<b>62</b>
<u>3.1 Contexte et objectifs du travail.....</u>	62
<u>3.2 Méthodologie.....</u>	62
<u>3.3 Résultats.....</u>	63
3.3.1- <i>Effet de la carence vitaminique A sur le poids corporel.....</i>	63
3.3.2 <i>Effet de 10 semaines de carence vitaminique A sur le profil</i>	
<i>neurométabolique.....</i>	64
3.3.3 <i>Effet d'une administration d'AR sur le profil neurométabolique.....</i>	65

<u>3.4 Discussion</u> .....	67
3.4.1 Effet de la carence.....	67
3.4.2 Spécificité d'action de l'acide rétinoïque.....	68
<u>3.5 Conclusion</u> .....	70

**CHAPITRE III**  
**CARENCE VITAMINIQUE A ET PROCESSUS**  
**AMYLOIDOGENE**

<b>1. Contexte scientifique</b> .....	<b>71</b>
<b>2. Effet d'une carence vitaminique A de 10 et 13 semaines sur l'expression des récepteurs de l'AR et celle de certains marqueurs du processus amyloïdogène</b> .....	<b>71</b>
<u>2.1. Méthodologie utilisée</u> .....	72
<u>2.2. Principaux résultats et discussion</u> .....	72

<b>Publication n°2 :</b>	<b>74</b>
<u>Retinoic acid normalizes nuclear receptor mediated hypo-expression of proteins involved in beta-amyloid deposits in the cerebral cortex of vitamin A deprived rats.</u> Husson M, Enderlin V, Delacourte A, Ghenimi N, Alfos S, Pallet V, Higuere P. <i>Neurobiol Dis.</i> 2006 Jul; <b>23(1):1-10.</b>	

<b>3. Effet d'une carence vitaminique A de 14 semaines sur l'expression de certains marqueurs du processus amyloïdogène et sur le taux de peptides A<math>\beta</math></b> .....	<b>85</b>
<u>3.1. Méthodologie utilisée</u> .....	85
<u>3.2. Principaux résultats et discussion</u> .....	85

<b>Publication n°3 :</b>	<b>87</b>
<u>Vitamin A hyposignalling modulates APP degrading processing.</u>	
Ghenimi N, Enderlin V, Troquier L, Redonnet A, Gallis JL, Beauvieux MC, Higuere P, Pallet V. En préparation pour <i>Neurobiology of aging</i> .	

# CHAPITRE IV

## HYPOTHYROIDIE ET PROCESSUS AMYLOIDOGENE

<b>1. Introduction.....</b>	<b>115</b>
<b>2. Contexte et objectif de l'étude.....</b>	<b>117</b>
<b>3. Méthodologie utilisée.....</b>	<b>117</b>
<b>4. Résultats.....</b>	<b>118</b>
<u>4.1 Le modèle d'hypothyroïdie.....</u>	<u>118</u>
<u>4.2 Effet d'une hypothyroïdie sur le taux d'ARNm des récepteurs TR et RAR dans le cortex et l'hippocampe des rats .....</u>	<u>119</u>
<u>4.3 Effet d'une hypothyroïdie sur l'expression des isoformes de l'APP dans le cortex et l'hippocampe des rats.....</u>	<u>119</u>
<u>4.4 Effet d'une hypothyroïdie sur l'expression de la protéine ADAM10 et sur l'activité <math>\alpha</math>-sécrétase dans le cortex et l'hippocampe des rats.....</u>	<u>120</u>
<u>4.5 Effet d'une hypothyroïdie sur l'expression des protéines BACE et PS1 ainsi que sur les activités <math>\beta</math>- et <math>\gamma</math>-sécrétases dans le cortex et l'hippocampe des rats.....</u>	<u>120</u>
<u>4.6 Effet d'une hypothyroïdie sur le taux de peptides A<math>\beta</math>-40 et A<math>\beta</math>-42 dans le cortex et l'hippocampe des rats.....</u>	<u>124</u>
<u>4.7 Effet d'une hypothyroïdie sur l'expression des protéines ApoD et IDE dans le cortex et l'hippocampe des rats .....</u>	<u>124</u>
<b>5. Discussion .....</b>	<b>126</b>

### Publication N°4 :

Hypothyroidism induced by PTU treatment activates amyloidogenic pathway in rats. Ghenimi N, Troquier L, Redonnet A, Gallis JL, Beauvieux MC, Higuere P, Pallet V, Enderlin V En préparation pour *Neurobiology of disease*.

## DISCUSSION GENERALE

<b>1. Rappel des principaux résultats.....</b>	<b>129</b>
1.1 <u>Modèle de carence vitaminique.....</u>	129
1.2 <u>Modèle d'hypothyroïdie.....</u>	130
<b>1. Conséquences d'une baisse d'activité de la voie de signalisation des rétinoïdes sur les processus de type neurodégénératifs.....</b>	<b>130</b>
<b>2. Conséquences d'une hypothyroïdie sur les processus de dégradation de la protéine APP.....</b>	<b>135</b>

## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>141</b>
---	------------



# LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1 :</b> Quelques composés appartenant à la famille des rétinoïdes .....	8
<b>Figure 2 :</b> Métabolisme général de la vitamine A.....	12
<b>Figure 3 :</b> Devenir du rétinol dans la cellule cible .....	13
<b>Figure 4 :</b> Exemples de membres de la superfamille des récepteurs nucléaires.....	16
<b>Figure 5 :</b> Organisation structurale des récepteurs nucléaires.....	17
<b>Figure 6 :</b> Mécanismes de régulation de la transcription par les récepteurs nucléaires.....	19
<b>Figure 7 :</b> La voie amyloïdogénique et non amyloïdogénique.....	33
<b>Figure 8 :</b> La protéine Tau associée aux microtubules par les résidus thréonine (T) et serine (S) soumis à l'action des kinases et phosphatases.....	35
<b>Figure 9 :</b> La plaque sénile.....	36
<b>Figure 10 :</b> Les trois étapes de la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).....	48
<b>Figure 11 :</b> Schéma global de neurochimie cellulaire.....	52
<b>Figure 12 :</b> Schéma hypothétique de l'action de l'acide rétinoïque au cours des processus adaptatifs liés à une carence en vitamine A.....	136

# LISTE DES TABLEAUX

<b><u>Tableau I</u></b> : Apports nutritionnels en vitamine A recommandés pour la population française.....	10
<b><u>Tableau II</u></b> : Taux de rétinoides dans différentes régions cérébrales chez la souris .....	14
<b><u>Tableau III</u></b> : Répartition des récepteurs de l'acide rétinoïque dans le système nerveux central.....	21
<b><u>Tableau IV</u></b> : Exemples de gènes impliqués dans le fonctionnement cérébral régulés par l'acide rétinoïque.....	22
<b><u>Tableau V</u></b> : Principales mutations identifiées pour l'APP.....	28
<b><u>Tableau VI</u></b> : Sites de phosphorylations spécifiques des PHF retrouvés dans la MA.....	34
<b><u>Tableau VII</u></b> : Sept stades décrivant le déclin des capacités cognitives (Global Deterioration Scale (DTS, échelle de Reisberg)).....	39
<b><u>Tableau VIII</u></b> : Récapitulatif de gènes cibles de l'AR impliqués dans la MA .....	44

## LISTE DES ABBREVIATIONS

<i>ADAM 10</i>	A disintegrin and metalloprotease 10
<i>ADH</i>	Alcool déshydrogénase
<i>ALDH</i>	Aldéhyde déshydrogénase
<i>Apo E</i>	Apolipoprotéine E
<i>Apo D</i>	Apolipoprotéine D
<i>APP</i>	Amyloid precursor protein
<i>APP-CTF</i>	APP carboxy terminal fragment
<i>AR</i>	Acide rétinoïque
<i>BACE</i>	Beta amyloid converting enzyme
<i>BDNF</i>	Brain Derived Neurotrophic Factor
<i>BHE</i>	Barrière hémato-encéphalique
<i>BMG</i>	$\beta$ 2-microglobuline
<i>ChAT</i>	Choline acétyl-transférase
<i>Cho</i>	Choline
<i>CRABP</i>	Cellular retinoic acid binding protein
	Cellular retinol binding protein
<i>DLT</i>	Dépression à long terme
<i>DNF</i>	Dégénérecences neurofibrillaires
<i>ER</i>	Equivalent rétinol
<i>GAP43</i>	Neuromoduline
<i>GDS</i>	Global deterioration scale
<i>Glx</i>	Glutamate-Glutamine
<i>GSH</i>	Glutathion
<i>HRMAS</i>	High Resolution Magic Angle Spinning
<i>HT</i>	Hormone thyroïdienne
<i>IDE</i>	Insulin degrading enzyme
<i>IRM</i>	Imagerie de résonance magnétique
<i>MA</i>	Maladie d'Alzheimer

<i>MAPT</i>	Microtubule associated protein Tau
<i>NAA</i>	N acetyl aspartate
<i>NGF</i>	Nerve Growth Factor
<i>NMDA</i>	N-méthyl-D-aspartate
<i>P75<sup>NTR</sup></i>	Pan neurotrophin receptor
<i>PBMC</i>	Human Peripheral Blood Mononuclear Cells
<i>PHF</i>	Paired helical filaments
<i>PLT</i>	Potentialisation à long terme
<i>PPIB</i>	Peptidylpropyle isomérase B
<i>PPRE</i>	Peroxisome proliferator response element
<i>PS1</i>	Préséniline 1
<i>PS2</i>	Préséniline 2
<i>PTU</i>	Propyl-thiouracile
<i>RALDH</i>	Rétinaldéhyde déshydrogénase
<i>RAR</i>	Retinoic acid receptor
<i>RARE</i>	Retinoic acid response element
<i>RBP</i>	Retinol binding protein
<i>RC3</i>	Neurogranine
<i>RMN</i>	Résonance Magnétique Nucléaire
<i>ROS</i>	Reactive oxygene species
<i>RXR</i>	Retinoid X receptor
<i>SNC</i>	Système nerveux central
<i>SRM</i>	Spectrométrie de resonance magnétique
<i>Tau</i>	Taurine
<i>TR</i>	Triiodothyronin receptor
<i>TRE</i>	Thyroid hormone response element:
<i>TrkA</i>	Tropomyosin-related kinase A: récepteur au NGF
<i>TrkB</i>	Tropomyosin-related kinase B: récepteur au BDNF
<i>TTR</i>	Transthyrétine
<i>UI</i>	Unité internationale

# INTRODUCTION GENERALE

Parmi les nutriments essentiels apportés par notre alimentation, la vitamine A occupe une place primordiale. En effet, elle est impliquée dans de nombreux processus fondamentaux tels que le développement embryonnaire, la vision, la différenciation cellulaire, l'immunité... (*Blomhoff and Blomhoff 2006*). Nos connaissances sur le mode d'action cellulaire de la vitamine A ont été fondamentalement marquées par la découverte des récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque, son métabolite actif (*Petkovich et al. 1987*). Ils appartiennent à une « superfamille » de récepteurs nucléaires, incluant également les récepteurs des hormones stéroïdes, de la vitamine D, des acides gras, des hormones thyroïdiennes etc (*McEwan 2009*). Ces données ont ouvert des champs nouveaux d'investigation dont l'un des plus prometteurs concerne l'intervention de cette vitamine dans les processus neurobiologiques qui sous-tendent les fonctions cognitives.

Ainsi, des travaux récents réalisés au laboratoire ont révélé qu'une biodisponibilité réduite en acide rétinoïque participerait, via une modification de l'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans la plasticité synaptique, à l'apparition de troubles mnésiques associés au vieillissement (*Etchamendy et al. 2001*). Une altération de l'activité de la voie de signalisation de l'acide rétinoïque serait alors à l'origine de l'hypoexpression de gènes cibles impliqués dans la plasticité synaptique comme celui codant pour la neurogranine. La restauration par l'acide rétinoïque de l'activité de sa voie d'action, de l'expression des gènes cibles et des capacités mnésiques, qui a été montrée dans certains modèles expérimentaux, dépendrait alors du niveau d'activité de la voie d'action des hormones thyroïdiennes (*Husson et al. 2003; Feart et al. 2005*).

La maladie d'Alzheimer (MA) se caractérise par la présence de plaques séniles composées (i) de dépôts amyloïdes constitués d'agrégats de peptides A $\beta$  et (ii) de dégénérescences neurofibrillaires provoquées par l'accumulation et l'hyperphosphorylation de la protéine tau. Des résultats obtenus post-mortem sur des cerveaux de patients atteints de la MA tendent à confirmer que le transport et la voie d'action des rétinoïdes est particulièrement altérée chez ces sujets et laissent supposer qu'une diminution de disponibilité de l'acide rétinoïque (AR, métabolite actif de la vitamine A) favoriserait la formation de dépôts amyloïdes (*Goodman 2006; Maden 2007*). Par ailleurs, des données cohérentes de la littérature montrent qu'une carence vitaminique A chez le rongeur conduit chez l'animal à une altération de plasticité synaptique, de neurogénèse et à des déficits mnésiques (*Etchamendy et al. 2001; Etchamendy et al. 2003; Bonnet et al. 2008*) ainsi qu'à l'apparition de dépôts de type amyloïde (*Corcoran et al. 2004*) dans les vaisseaux cérébraux ; ces modifications sont considérées comme des marqueurs de la MA.

Mon travail de thèse a eu pour objectif de préciser l'implication de l'hypoactivité de la voie d'action des rétinoïdes dans certains processus de type neurodégénératifs associés à la MA.

Les données présentées dans le **Chapitre I** décrivent dans un premier temps le mode d'action de la vitamine A, son rôle dans le cerveau mature et soulignent les conséquences d'une baisse d'activité de la voie de signalisation de la vitamine A sur le déclin des processus neurobiologiques et mnésiques associés au vieillissement. Dans un second temps, après avoir résumé les caractéristiques de cette pathologie, nous rapportons les données de la littérature

qui laissent supposer un rôle potentiel de la vitamine A dans l'étiologie de la maladie d'Alzheimer.

Une première étude expérimentale (**Chapitre II**) réalisée chez le rat carencé en vitamine A a permis par l'utilisation innovante d'outils tels que l'imagerie de Résonance Magnétique et la Spectrométrie haute résolution de type HRMAS de révéler les profondes altérations morphologiques et métaboliques associées à la baisse d'activité de la voie de signalisation des rétinoïdes. Des liens forts ont ainsi pu être suggérés entre l'hypoactivité de cette voie et l'apparition de troubles de type neurodégénératifs.

Une deuxième étude a consisté, par une approche moléculaire, à préciser l'implication de la voie de signalisation des rétinoïdes dans la régulation des processus de dégradation de la protéine Amyloid Precursor Protein (APP) (**Chapitre III**). Les résultats obtenus montrent que la baisse d'activité de la voie de signalisation des rétinoïdes induit des déséquilibres entre les voies physiologique et pathologique de dégradation de la protéine APP.

L'existence d'interactions fortes entre la voie d'action des rétinoïdes et celle des hormones thyroïdiennes (HT) associée aux rôles primordiaux des HT dans le SNC a permis de suggérer l'implication des HT dans l'apparition de troubles de type neurodégénératifs. Ainsi, la dernière partie de ce travail (**Chapitre IV**) a porté sur l'étude des conséquences d'une hypothyroïdie sur ces mêmes processus de dégradation de la protéine APP. Les résultats suggèrent que l'hypoactivité de la voie de signalisation de la T3 (forme active des HT) apparaît comme un facteur majeur dans la régulation de ces processus.

Les résultats de ce travail ont fait l'objet de deux publications acceptées, une en préparation pour le **Chapitre III**. Une quatrième publication sera rédigée ultérieurement et portera sur le **Chapitre IV**.

# CHAPITRE I

## DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

### I La vitamine A et le système nerveux central

#### 1. Généralités sur la vitamine A

La vitamine A ou rétinal (en référence à son action au niveau de la rétine), ainsi que ses dérivés, les rétinoïdes, sont impliqués dans de nombreuses fonctions biologiques fondamentales telles que la vision, le développement embryonnaire (Ross *et al.* 2000), l'immunité (Reifen 2002), les processus de croissance cellulaire (Maden *et al.* 1998; Maden *et al.* 2003). Un apport insuffisant (hypovitaminose) ou excessif (hypervitaminose) en vitamine A entraîne des effets néfastes à long terme et peut être la cause de diverses pathologies. De nos jours, la carence en vitamine A causée par la sous-alimentation ou la malnutrition constitue un problème sérieux de santé publique en particulier dans les pays en voie de développement dans lesquels 200 millions d'adultes et d'enfants souffrent encore de ce fléau (Sommer 1995; Filiberti *et al.* 1997). Cette carence vitaminique altère non seulement les fonctions visuelles pouvant conduire à la cécité, mais aussi d'autres fonctions cérébrales importantes. Les rôles essentiels joués par la vitamine A dans le développement du système nerveux central (SNC) sont aujourd'hui bien documentés (Maden *et al.* 1998), mais ce n'est que récemment que son rôle dans le cerveau adulte a été découvert (Malik *et al.* 2000; Mey *et al.* 2004; Lane *et al.* 2005; Tafti *et al.* 2007). Un champ de recherche innovant a été ouvert et nos travaux contribuent à son exploration.

#### 1.1 Définition

La vitamine A ou rétinal compte de nombreux dérivés métaboliques, composés naturels ou analogues synthétiques, rassemblés sous le terme de « rétinoïdes ». Les molécules de cette famille possèdent de nombreuses similitudes de structure et de fonctions (Sporn *et al.* 1994; Blomhoff and Blomhoff 2006) (**Figure 1**). Leur structure isoprénique qui leur confère leur caractère lipophile justifie leur nécessité d'être associés à des protéines de liaison spécifiques permettant le transport, le stockage et le métabolisme de la vitamine A. La structure particulière de chaque rétinoïde liée à sa fonction (alcool, aldéhyde ou acide) portée par la chaîne latérale et à la configuration de ses doubles liaisons (cis ou trans) participe à sa spécificité d'action. En solution, l'isomérisation (cis/trans) peut-être induite par différents facteurs comme la lumière ou l'oxygène, c'est pourquoi des précautions particulières doivent être prises lors de la manipulation et de l'analyse de ces composés (Aust *et al.* 2001). Dans la cellule cible, un métabolisme oxydatif conduit à la production, à partir du rétinal, de rétinal qui peut ensuite être converti de manière irréversible en acide rétinoïque (AR). Ainsi, les principaux métabolites actifs de la vitamine A sont le rétinal, molécule essentielle pour la vision, et l'AR, puissant régulateur de l'expression génique.





tels que carottes, épinards, choux (...) ainsi que dans certains fruits (oranges, abricots, mangues).

Parmi les caroténoïdes, 50 servent de précurseurs de la vitamine A chez l'homme : les plus abondants étant l' $\alpha$  et le  $\beta$  carotène. Le  $\beta$  carotène semble le plus efficace des précurseurs, pourvu d'activités biologiques étendues.

Les besoins en vitamine sont difficiles à établir précisément car ils varient en fonction de l'âge, du sexe ou encore de l'activité des sujets. Ils augmentent d'une manière générale durant la croissance, lors de maladies ou d'états fébriles, chez le fumeur et chez les femmes pendant la grossesse et l'allaitement ainsi que chez celles prenant des contraceptifs oraux. Autrefois exprimés en UI (Unité Internationale), les apports conseillés s'expriment aujourd'hui en  $\mu\text{g}$  ( $1\mu\text{g}$  rétinol = 3,3UI) ou en ER équivalent rétinol (1ER =  $1\mu\text{g}$  de rétinol =  $6\mu\text{g}$  de  $\beta$  carotène), cette dernière unité présentant l'avantage d'inclure les caroténoïdes précurseurs de la vitamine A. Les apports recommandés (**Tableau I**) ont été calculés à partir de la quantité assurant la meilleure adaptation à la vision nocturne. Cette quantité a été triplée pour tenir compte des variabilités individuelles.

Actuellement, on considère qu'une alimentation « normale » des habitants dans les pays développés apporte la vitamine A nécessaire. Deux enquêtes nutritionnelles réalisées en France, ASPCC et SU.VI.MAX montrent que la population française a un statut en vitamine A suffisant. Les états de carence prononcés se retrouvent dans les pays en voie de développement. Cette carence difficilement dissociable du contexte global de malnutrition est caractérisée par des lésions cutanées, une xérophtalmie (ramollissement de la cornée pouvant conduire à la cécité) accompagnée de cécité nocturne, un ralentissement de la croissance chez l'enfant ainsi que des troubles du système reproductif.

En cas d'excès de vitamine A (plus rare), les symptômes décrits sont des problèmes de desquamation cutanée et du cuir chevelu, des troubles visuels, digestifs, une déminéralisation osseuse ainsi que chez la femme enceinte des risques de tératogénèse lors du développement embryonnaire touchant principalement le tube neural (cette liste n'étant pas exhaustive) (Botto *et al.* 2004).

Aujourd'hui, les rétinoïdes sont utilisés comme agents thérapeutiques dans de nombreuses indications comme le traitement du cancer, de la peau, de l'infection au VIH ou encore dans le diabète de type 2 (Vivat-Hannah and Zusi 2005).

**Tableau I :** Apports nutritionnels en vitamine A recommandés pour la population française.

(Source : Apports nutritionnels conseillés pour la population française, Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, 2007)

Tranche d'âge	Apports conseillés ( $\mu\text{g ER/jour}$ )*
Nourrissons	350
Enfants 1-3 ans	400
Enfants 4-6 ans	450
Enfants 7-9 ans	500
Enfants 10-12 ans	550
Adolescents 13-15 ans	700
Adolescentes 13-15 ans	600
<b>Adolescents 16-19 ans et hommes adultes</b>	<b>800</b>
<b>Adolescentes 16-19 ans et femmes adultes</b>	<b>600</b>
Personne âgée de plus de 75 ans	700 (hommes) 600 (femmes)
Femmes enceintes (3 <sup>ème</sup> trimestre)	700
Femmes allaitantes	950

ER : équivalent rétinol, 6 $\mu\text{g}$  de  $\beta$  carotène ont la même activité vitaminique que 1  $\mu\text{g}$  de rétinol soit 1 ER

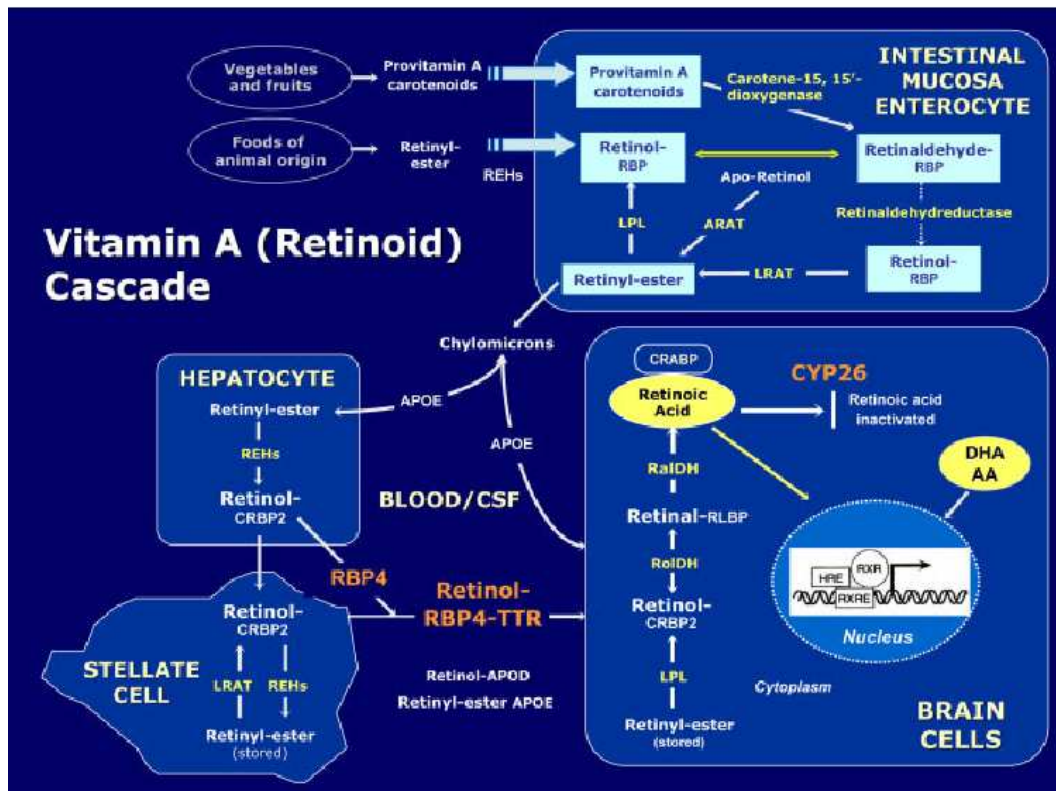
## 2. Métabolisme général de la vitamine A

### 2.1 De la lumière intestinale à la cellule cible

La vitamine A absorbée au niveau de l'intestin grêle, peut suivre deux circuits d'utilisation en fonction des besoins physiologiques : soit elle est captée par les cellules hépatiques pour être stockée quand le statut en vitamine A est satisfaisant, soit elle est directement utilisée dans divers tissus cibles quand ce statut est déficient. Le métabolisme de la vitamine A se décompose en trois étapes : (i) l'absorption intestinale (à dose physiologique, 80 à 90% de la vitamine A et 50 à 60% des caroténoïdes de la ration alimentaire sont absorbés), (ii) le métabolisme hépatique (mise en réserve de 90% de la vitamine A de l'organisme dans les cellules de Ito), et (iii) la mobilisation et le transport de la vitamine A et jusqu'aux tissus cibles tels que le cerveau (Ross *et al.* 2001).

La conversion des caroténoïdes pro-vitaminiques A en rétinol a lieu essentiellement dans la muqueuse intestinale. Le rétinol nouvellement formé, ainsi que celui apporté par l'alimentation constitue la forme la plus abondante dans le sang. Il est ensuite estérifié en rétinyls esters par différentes enzymes (LRAT : Lécithine Rétinol Acyl-Transférase et ARAT : Acyl-CoA Rétinol Acyl-Transférase) dans la muqueuse intestinale et transporté vers le foie, *via* les chylomicrons, qui assurent la mise en réserve sous forme de rétinyls esters. En fonction des besoins de l'organisme, les rétinyl esters seront hydrolysés en rétinol libre qui sera sécrété dans le plasma, véhiculé par un complexe protéique assurant le transport de 95-99% de la vitamine A circulante. Il est composé de la Retinol Binding Protein RBP (21kD) liant spécifiquement la molécule de rétinol, et de la transthyrétine ou TTR (Monaco 2000) qui permet de réduire la filtration glomérulaire du rétinol par sa haute masse moléculaire (55kD) et d'augmenter l'affinité de RBP pour le rétinol (Bellovino *et al.* 2003). Au niveau de la cellule cible, le rétinol serait capté grâce à une interaction de la RBP avec un récepteur membranaire récemment découvert STRA6 (Kawaguchi *et al.* 2007). Une fois dans le cytoplasme, le rétinol est pris en charge par une protéine de transport cytoplasmique, la CRBP (Cellular Retinol Binding Protein).

Le flux de rétinol libéré par le foie est très finement régulé de manière à maintenir une concentration de rétinol dans le plasma de 1 à 2 $\mu$ mol/l (AFSSA 2001). On trouve également de l'AR à une concentration équivalente à environ 1% de celle du rétinol circulant. Au-delà des besoins immédiats, la vitamine A alimentaire permet de constituer des réserves hépatiques qui seront utilisées au cours des périodes d'apports insuffisants (Ross 2003) (Figure 2).



**Figure 2 :** Métabolisme général de la vitamine A d'après Goodman (2006).

## 2.2 Devenir du rétinol dans la cellule cible

Dans la cellule cible, le rétinol va principalement être transformé en acide rétinoïque, métabolite actif de la vitamine A (Napoli 1996). Il a été décrit des voies cytosoliques et microsomales dans les processus d'oxydation du rétinol en acide rétinoïque (AR) (Figure 3). Cette oxydation est un processus enzymatique en deux étapes dont le rétinol est le métabolite intermédiaire, la première oxydation étant réversible et la deuxième irréversible. Dans le cytoplasme, la formation du composé intermédiaire, le rétinol, peut être catalysée par des alcools déshydrogénases (ADH) (Boleda et al. 1993; Yang et al. 1994; Ross et al. 2001). Les enzymes impliquées dans cette première étape de synthèse de l'AR ne sont pas encore toutes bien définies et il existe de nombreux candidats. Des études réalisées chez la souris révèlent des rôles physiologiques des ADH1 et ADH4 (Duester et al. 2003). Une voie microsomale de métabolisation du rétinol en rétinaldéhyde a également été mise en évidence, suite à une étude menée chez des souris « knock out » pour l'ADH, qui étaient toujours capables de synthétiser du rétinol à partir du rétinol (Napoli et al. 1992). Le rétinol lié à la protéine de liaison cytosolique CRBP est un substrat pour deux déshydrogénases microsomales RoDH1 ou RDH1 et RoDH2 ou RDH2 (Napoli 1999; Napoli 1999). Le rétinol peut ensuite être converti de manière irréversible en AR par des aldéhydes déshydrogénases (ALDH) cytosoliques (Chen et al. 1994). Par la suite, certaines ALDH ont été identifiées comme étant spécifiques du rétinol (McCaffery et al. 1994; Zhao et al. 1996) et ont été renommées RALDH. Ainsi, des études *in vivo* montrent que les RALDH1 et RALDH2 seraient impliquées dans la synthèse d'AR (Duester et al. 2003). Alors que les ADH sont

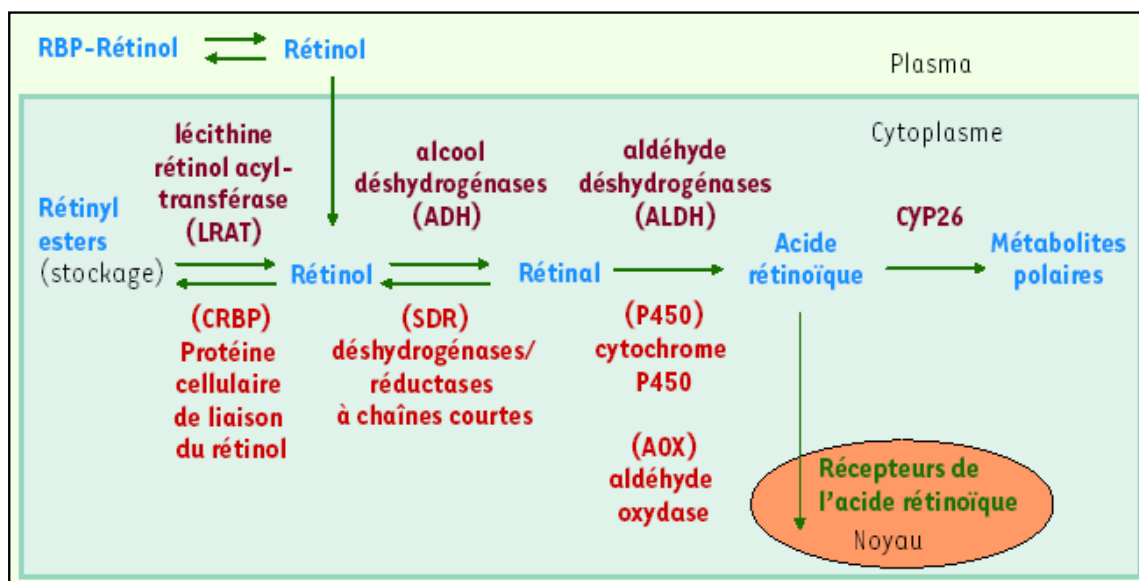
ubiquitaires, les ALDH sont beaucoup plus localisées, et sont les enzymes clés qui déterminent les lieux de synthèse de l'AR (Duester 2000). Par ailleurs, il a été montré que certaines isoformes microsomiales des cytochromes P450 humains peuvent oxyder le rétinol en AR (Zhang et al. 2000). Ce métabolite peut ensuite être soit pris en charge dans une cellule cible par une protéine de transport la CRABP (Cellular Retinoic Acid Binding Protein), soit dégradé par la CYP26 qui appartient une famille de cytochromes P450 (Yamamoto et al. 2000)

### 2.3 Transport et métabolisme cérébral de la vitamine A

La vitamine A est connue depuis longtemps pour ses fonctions dans le développement du système nerveux central, mais ce n'est que récemment que son rôle dans le cerveau adulte a été identifié (pour revues voir Malik et al. 2000; Drager 2006; Maden 2006; McCaffery et al. 2006; Maden 2007; Bremner et al. 2008).

#### 2.3.1 Transport vers le cerveau :

A ce jour, quelques données sont disponibles concernant le transport du rétinol à travers la barrière hémato-encéphalique (BHE). Yamagata et al. (1993) ont identifié un transport jusqu'au cerveau de l'AR injecté dans la cavité péritonéale. D'autres résultats obtenus dans des conditions d'apports suffisants en vitamine A chez le rat, ont montré que 90% de l'AR total du cerveau n'est pas synthétisé localement mais provient du pool circulant dans le plasma (Kurlandsky et al. 1995). Par la suite, l'isomère AR tout-trans a été identifié comme étant la forme la plus largement transportée du sang au cerveau par rapport aux deux autres isoformes, l'AR 13-cis et l'AR 9-cis (Le Doze et al. 2000). Par ailleurs, il a été signalé la présence d'AR au niveau cérébral, chez des rats carencés en vitamine A traités avec de l'AR, l'hippocampe et le cortex contenant les proportions les plus importantes (Werner and Deluca 2002). L'origine de l'AR dans le cerveau semble donc largement exogène dans des situations d'apports suffisants en vitamine A.



**Figure 3 :** Devenir du rétinol dans la cellule cible

D'après Parisotto et al. 2006.

2.3.2 Métabolisme cérébral :

Bien que l'apport en AR au niveau cérébral soit largement exogène, le cerveau adulte possède toute la machinerie nécessaire à la synthèse de l'AR, à son transport et à son action nucléaire (Zetterstrom et al. 1999; Lane et al. 2005).

L'identification de protéines de liaison des rétinoïdes et des enzymes impliquées dans la biosynthèse de l'AR dans le cerveau adulte plaide en faveur d'un métabolisme cérébral du rétinol. En effet, la présence des protéines de transport CRBP et CRABP (Zetterstrom et al. 1994; Zetterstrom et al. 1999), des enzymes de conversion ADH1, ADH4 (Martinez et al. 2001) et RALDH (McCaffery and Drager 1994) a été révélée dans certaines structures du cerveau adulte telles que l'hippocampe et le striatum, zones particulièrement impliquées dans les processus mnésiques.

Outre la mise en évidence des enzymes intervenant dans le métabolisme de la vitamine A, le cerveau adulte est capable de synthétiser *de novo* et ce de façon efficace de l'AR (Dev et al. 1993). Cette synthèse d'AR a été révélée dans le cerveau de souris adulte et plus particulièrement dans le striatum, où elle serait plus importante que dans l'hippocampe (McCaffery and Drager 1994). Cependant, l'équipe de Sakai et al., en 2004 a montré que l'AR est synthétisé par la RALDH2 au niveau des méninges adjacentes à l'hippocampe. Enfin, la présence de rétinol et surtout des rétinyl esters (**Tableau II**), a pu être mise en évidence dans l'hippocampe de cerveau humain mature (Connor et al. 1997; Werner et al. 2002).

**Tableau II :** Taux de rétinoïdes dans différentes régions cérébrales chez la souris  
D'après Kane et al. 2005; Kane et al. 2008

<i>Serum/tissue</i>	<i>RE(nmol/g)</i>	<i>ROL (nmol/g)</i>	<i>RAL (pmol/g)</i>	<i>At RA(pmol/g)</i>	<i>13 cis RA(pmol/g)</i>
<i>Serum</i>	0.22 ± 0.02	0.81 ± 0.04	32.2 ± 6.2	1.9 ± 0.4	1.2 ± 0.3
<i>Liver</i>	562.6 ± 75.9	9.6 ± 0.9	160.9 ± 14.3	9.6 ± 1	3.6 ± 0.6
<i>Brain</i>	0.84 ± 0.16	0.68 ± 0.23	---	7.7 ± 0.9	4.2 ± 1.3
<i>Hippocampus</i>	0.70 ± 0.05	0.30 ± 0.03	---	8.4 ± 1.2	7.8 ± 0.8
<i>Cortex</i>	0.35 ± 0.04	0.08 ± 0.01	---	2.6 ± 0.4	1.8 ± 0.3
<i>olfactory bulb</i>	0.63 ± 0.03	0.20 ± 0.02	---		
<i>Thalamus</i>	0.47 ± 0.06	0.20 ± 0.04	---		
<i>Cerebellum</i>	0.73 ± 0.10	0.42 ± 0.08	---	10.7 ± 0.3	3.0 ± 0.8
<i>Striatum</i>	0.41 ± 0.08	0.21 ± 0.05	---	15.3 ± 4.7	8.0 ± 2.2

RE : retinyl esters, ROL : retinol, RAL : retinaldhehyde, At RA : all trans retinoic acid, 13 cis RA : 13 cis retinoic acid

### 3. Mode d'action de l'acide rétinoïque, métabolite actif de la vitamine A

Le mode d'action cellulaire de la vitamine A s'apparente à celui d'une hormone lipophile. Pour rappel, deux principaux systèmes hormonaux sont rencontrés dans les cellules : (1) les hormones hydrophiles qui ne traversent pas la membrane cellulaire et se lient à des récepteurs membranaires, déclenchant une cascade biochimique de second messagers, (2) les hormones lipophiles, capables de traverser la membrane cellulaire qui vont agir directement dans le noyau, en se liant à des récepteurs spécifiques. La présentation de ces récepteurs nucléaires fait l'objet de ce chapitre.

#### 3.1 La superfamille des récepteurs nucléaires

Dans la cellule cible, l'acide rétinoïque agit via des récepteurs appartenant à une superfamille de récepteurs nucléaires et régule la transcription de gènes cibles. Les récepteurs nucléaires sont des protéines transrégulatrices qui se fixent généralement sous forme de dimères au niveau de sites spécifiques de l'ADN appelés éléments de réponse et situés dans le promoteur du gène cible (*Mangelsdorf et al. 1995; Evans 2005*). Il existe une forte homologie de structure entre les membres de la superfamille des récepteurs nucléaires (*Novac and Heinzel 2004*) qui comprend les récepteurs de différents ligands hydrophobes : les hormones stéroïdiennes, les hormones thyroïdiennes, certains acides gras polyinsaturés (DHA, ...) et eicosanoïdes, les dérivés de la vitamine D et ceux de la vitamine A (**Figure 4**).

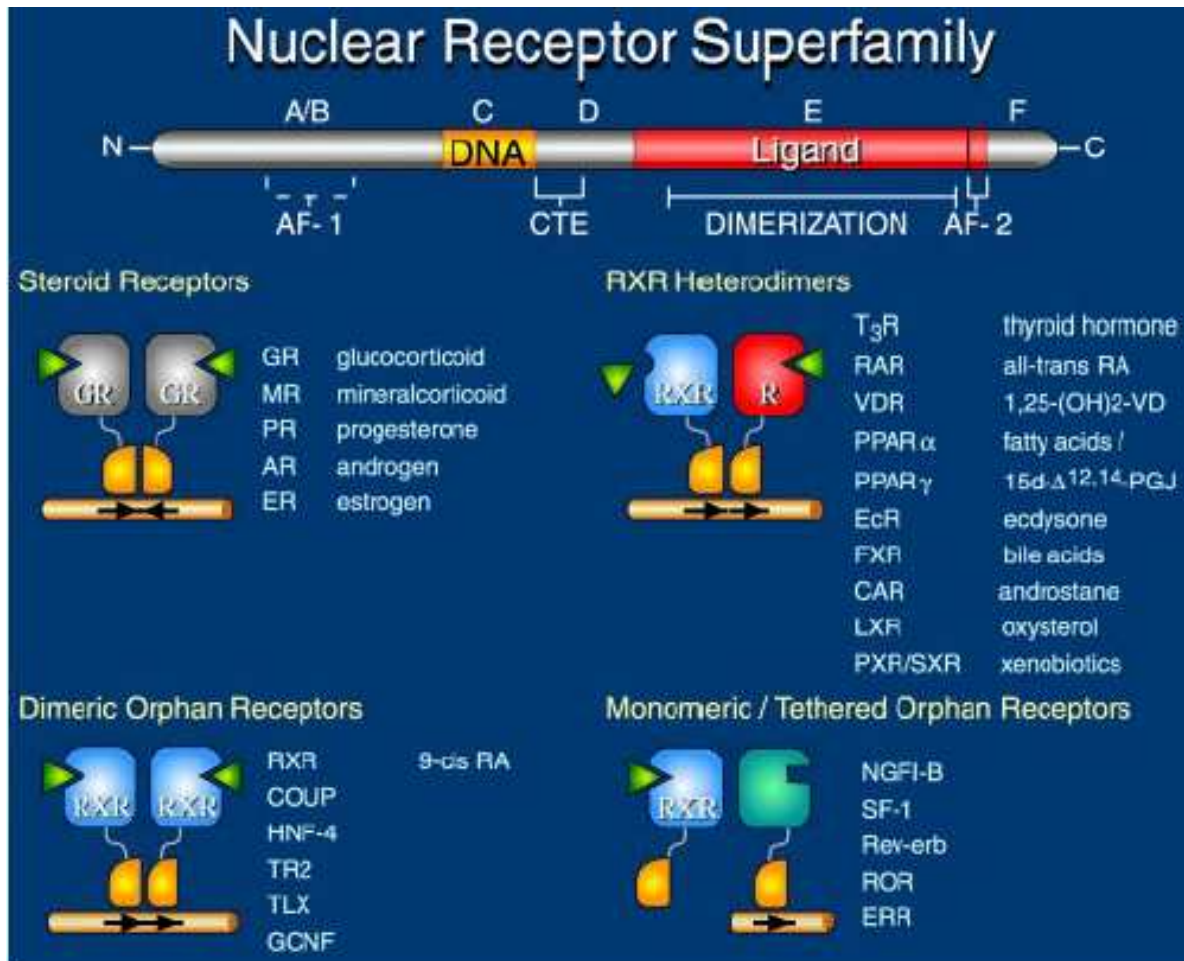
On peut ainsi les regrouper en quatre sous familles en fonction du ligand, de la liaison à l'ADN et des propriétés de dimérisation (*Olefsky 2001*).

- ◆ Les récepteurs des stéroïdes (récepteurs des glucocorticoïdes, des œstrogènes...)
- ◆ Les récepteurs des rétinoïdes (RAR), des hormones thyroïdiennes (TR) ou de certains acides gras polyinsaturés et eicosanoïdes (PPAR) formant des hétérodimères avec RXR
- ◆ Les récepteurs homodimériques
- ◆ Les récepteurs monomériques

Certains récepteurs de la superfamille n'ont pas de ligand connu à ce jour, c'est pourquoi ils ont été regroupés sous le terme de récepteurs orphelins et appartiennent en général aux deux dernières sous familles (*Enmark and Gustafsson 1996*).

##### 3.1.1 Structure :

Les récepteurs nucléaires ont dans leur structure protéique quatre domaines principaux possédant divers degrés de conservation entre les différents membres de la superfamille (**Figure 5**) :



**Figure 4 :** Exemples de membres de la superfamille des récepteurs nucléaires.

D'après (Olefsky 2001)

Abréviations : GR : récepteur des glucocorticoïdes ; MR : récepteur des minéralocorticoïdes ; PR : récepteur de la progestérone ; AR : récepteur des androgènes ; ER : récepteur de l'œstrogène ; T<sub>3</sub>R : récepteur de la triiodothyronine ; RAR : récepteur de l'AR tout-trans ; VDR : récepteur de la vitamine D3 ; PPAR : récepteur des activateurs de prolifération peroxysomale ; EcR\* : récepteur de l'ecdysone ; FXR : récepteur des acides biliaires ; CAR\* : récepteur de l'androstane ; LXR\* : récepteur de l'oxystérol ; PXR/SXR\* : récepteur des xénobiotiques ; RXR : récepteur de l'acide 9-cis rétinolique ; divers récepteurs orphelins dont ERR : récepteur apparenté au récepteur de l'œstrogène ; HNF-4 : facteur nucléaire mis en évidence dans l'hépatocyte ; TR2 : récepteur testiculaire.

- Anciens récepteurs orphelins dont les ligands ont été identifiés récemment

⊗ Le domaine A/B : ce domaine, impliqué dans la transactivation de manière indépendante du ligand, est faiblement conservé et correspond à l'extrémité -NH<sub>2</sub> de la protéine codée.

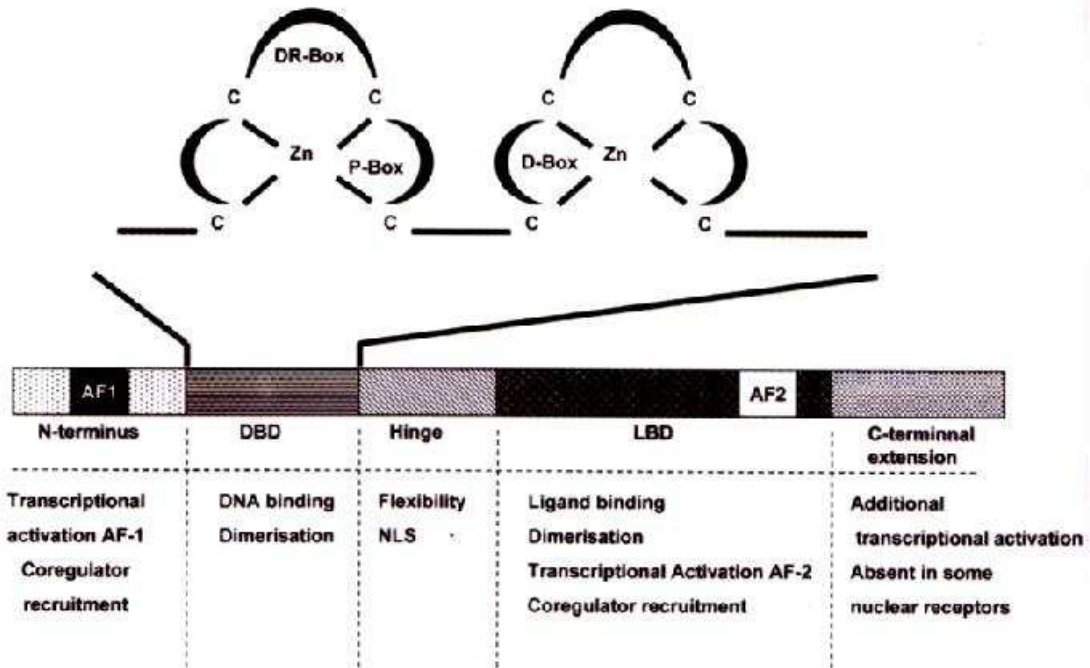
⊗ Le domaine C : ce domaine de liaison à l'ADN avec deux motifs en doigt de zinc, montre un fort degré d'homologie entre les différents membres de la superfamille. Ce domaine participe aussi à la dimérisation des récepteurs.



⌘ Le domaine D : cette région charnière entre les domaines C et E permet la réalisation de différentes configurations fonctionnelles. Elle pourrait être impliquée dans la localisation nucléaire des récepteurs.

⌘ Le domaine E : ce domaine carboxy-terminal permet la fixation du ligand et joue un rôle aussi dans la dimérisation et la régulation de la transcription indépendante du ligand.

⌘ Le domaine F : certains membres de la superfamille, et c'est le cas des RARs, des récepteurs des oestrogènes et de ceux des hormones thyroïdiennes, possèdent en plus un domaine F, domaine variable de la région C-terminale (O'Malley 1990).



**Figure 5** : Architecture des récepteurs nucléaires.

*D'après Novac et Heinzel, (2004)*

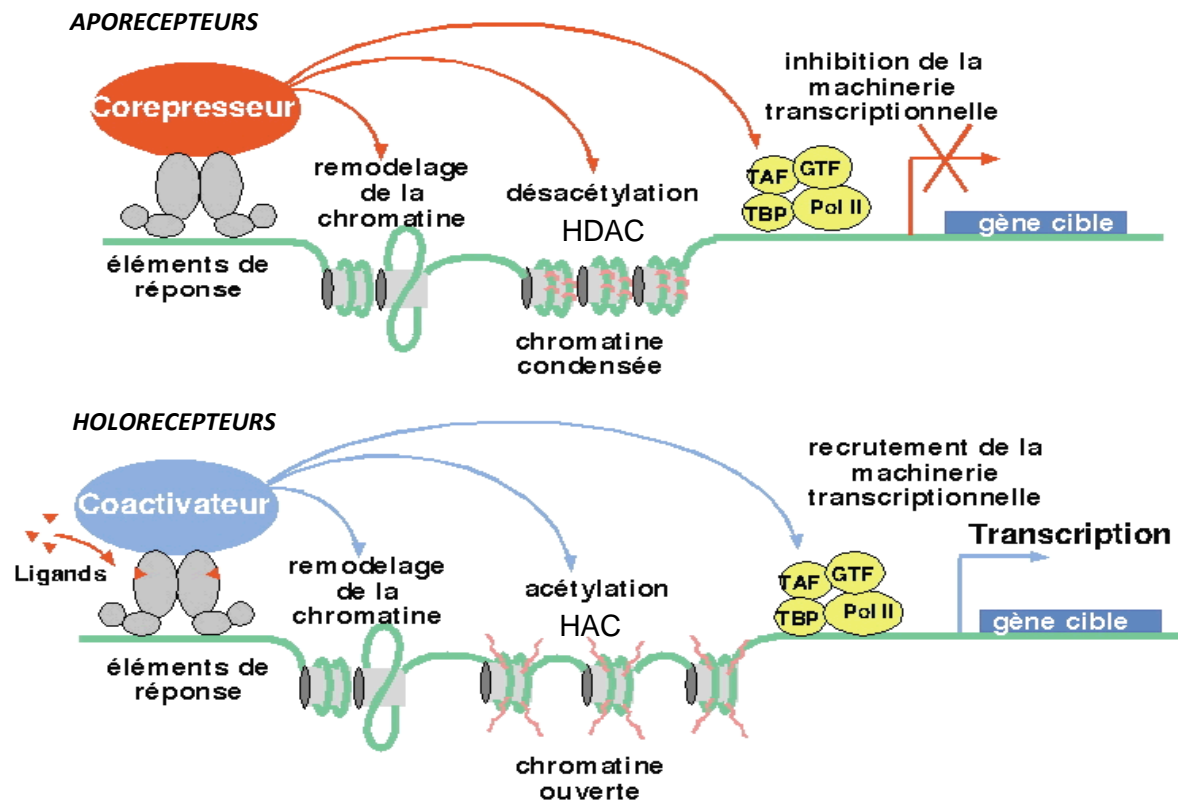
### 3.1.2 Les éléments de réponse

Les récepteurs nucléaires, protéines liées à leur ligand, sont capables de se fixer généralement sous forme de dimères au niveau de séquences spécifiques de l'ADN appelées éléments de réponse aux hormones (HRE : Hormone Response Element) situées en amont du gène cible et de moduler en tant que facteurs de transcription l'expression de ces gènes (Fuller 1991; Lazar 2003). Il existe différents HRE spécifiques du récepteur responsable de l'activation de la transcription (par exemple RARE pour Retinoic Acid Response Element, PPRE pour Peroxisome Proliferator Response Element, TRE pour Thyroid Response Element). La meilleure activité transcriptionnelle sur ces éléments de réponse est obtenue par la liaison d'hétérodimères, formés de deux types de récepteurs. Les RXRs dont le ligand est l'AR 9-cis sont le partenaire d'hétérodimérisation le plus commun (Chin et al. 1997; Rastinejad 2001; Chambon 2005). Ils constituent des coactivateurs de nombreux récepteurs nucléaires

dont les RARs, les TRs, ou encore les PPARs et jouent ainsi un rôle central dans la régulation de l'expression génique.

Les travaux de recherche de ces dernières années ont montré que les récepteurs nucléaires sont au centre d'un système complexe de régulation, et que la fixation du ligand n'est pas toujours suffisante pour que le récepteur induise l'expression d'un gène (*Katzenellenbogen et al. 1996*). Le récepteur doit alors interagir, soit directement, soit indirectement avec la "machinerie" de transcription pour induire l'expression du gène cible. Des protéines appelées cofacteurs de transcription régulent l'activité transcriptionnelle de ces récepteurs, leur permettant soit d'activer (coactivateurs), soit de réprimer (corépresseurs) l'expression d'un gène (*Perissi and Rosenfeld 2005*). Le nombre connu de cofacteurs ne cesse d'augmenter ce qui souligne la complexité de leur mode d'action avec les récepteurs nucléaires (*Freedman 1999; Freedman 1999; Freedman 1999*). La capacité de ces cofacteurs à interagir avec plusieurs récepteurs leur confère un rôle central dans l'intégration des signaux hormonaux, d'autant plus qu'ils sont présents en quantité limitée dans la cellule. *Klein et al. (2000)* montrent, avec l'exemple des récepteurs de l'AR, que le recrutement des corégulateurs peut varier et serait dépendant de la nature des ligands.

L'activation des récepteurs nucléaires passe par l'action de ces cofacteurs (**Figure 6**). Dans une première étape, la fixation du ligand sur son récepteur provoque un changement de conformation de ce dernier permettant une activité transcriptionnelle basale après le relargage des corépresseurs. Dans une deuxième étape, les coactivateurs de transcription peuvent se fixer sur l'hétérodimère, créant ainsi un "pont" entre ces récepteurs et le complexe de transcription, ce qui entraîne une expression maximale du gène (*Lefebvre et al. 2005; Perissi and Rosenfeld 2005*).



**Figure 6 :** Mécanismes de régulation de la transcription par les récepteurs nucléaires.

En absence de ligand, les récepteurs nucléaires ou aporécepteurs (LBD libre) sont associés à des complexes de corépresseurs, recrutant des protéines ayant une activité histone désacétylase. La désacétylation des histones entraîne une compaction de la chromatine, conduisant à une répression transcriptionnelle. La fixation du ligand entraîne une libération des corépresseurs, un recrutement de coactivateurs sur ces holorécepteurs (LBD occupé) et une décompaction de la chromatine, permettant l'activation de la transcription. HDAC : histones désacétylases ; HAC : histones acétyltransférases ; Pol II : ARN polymérase II ; TBP : TATA binding factor ; TAF : TBP associating factor ; GTF: general transcription factors.

### 3.2 Les récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque

Nos connaissances sur le mode d'action de la vitamine A ont été fondamentalement marquées par la découverte de ses récepteurs nucléaires ((Giguere et al. 1987); (Petkovich et al. 1987)) et la mise en évidence de leur action en tant que facteurs de transcription, dans le contrôle de l'expression de gènes (Chambon 1996). Aujourd'hui, de nombreux travaux cherchent à préciser les mécanismes d'intervention des rétinoïdes dans la signalisation cellulaire et à mieux définir, en particulier, le rôle de leurs récepteurs dans la transcription génique (Bastien and Rochette-Egly 2004).

#### 3.2.1 Les différents récepteurs

Il existe deux types de récepteurs de l'acide rétinoïque. Le premier type comprend les récepteurs RAR (Retinoic Acid Receptor) qui présentent une forte affinité pour l'acide tout-trans rétinoïque (Ishikawa et al. 1990; Yang et al. 1991; Germain et al. 2006). Le deuxième type comprend les RXR (Retinoid X Receptor) dont l'affinité est élevée pour l'acide 9-cis

rétinoïque, mais plus faible pour l'AR tout-trans (Heyman et al. 1992; Levin et al. 1992; Germain et al. 2006). La masse moléculaire de ces récepteurs est d'environ 50 kDa. Chacun d'eux présente trois isoformes, différenciées au niveau des domaines A et F, mais similaires pour les autres domaines. Ces isoformes sont RAR  $\alpha$   $\beta$   $\gamma$  et RXR  $\alpha$   $\beta$   $\gamma$  (Chambon 1996). Ces récepteurs de l'AR agissent comme facteurs de transcription, s'associant sous forme d'homodimères de RXR ou d'hétérodimères RAR-RXR.

### 3.2.2 Régulation de la voie d'action

La concentration cellulaire en AR détermine le niveau d'expression de certains gènes notamment ceux codant pour ses propres récepteurs : on parle dans ce cas d'autorégulation. C'est le cas des trois isoformes de RXRs (Wan 1993; Wan et al. 1994). En ce qui concerne les RARs, plusieurs études réalisées chez des animaux carencés en vitamine A ont montré une diminution de l'expression de RAR $\beta$ , sa réinduction après l'administration d'AR et aucune modification de l'expression des autres isoformes RAR $\alpha$  et RAR $\gamma$  (Kato et al. 1992). Il semble en effet que ces deux dernières isoformes soient peu sensibles à l'administration d'AR tout trans et ne s'exprime qu'en présence d'une forte concentration de cet acide. Ainsi, l'expression de RAR $\beta$  est autorégulée, un RARE ayant été découvert dans sa séquence promotrice (de The et al. 1990). D'autres études ont confirmé *in vivo* ce phénomène d'autorégulation des récepteurs RAR $\beta$  (Enderlin et al. 2000; Husson et al. 2004).

### 3.2.3 Hétérodimérisation

Le récepteur RXR, considéré comme le partenaire commun majeur de dimérisation avec les autres membres de la famille des récepteurs nucléaires joue un rôle central dans la régulation génique. Cette hétérodimérisation permet une interaction entre différentes voies hormonales. Les hétérodimères TR/RXR et RAR/RXR sont les principaux médiateurs de l'action transactivatrice de la triiodothyronine (T3) et de l'AR (Glass 1994; Schrader and Carlberg 1994; Chambon 2005). Ainsi, les propriétés d'hétérodimérisation des RXR rendent la voie des rétinoïdes indissociable au plan fonctionnel d'autres voies comme celle des hormones thyroïdiennes ce qui rend complexe la compréhension des phénomènes impliquant la voie de signalisation des rétinoïdes. Ces réseaux de signalisation nucléaire s'organisent en fonction de nombreux facteurs cellulaires et selon la nature des gènes cibles.

### 3.2.4 Distribution tissulaire et cérébrale des récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque

Différents travaux ont permis de préciser la répartition des récepteurs nucléaires des rétinoïdes (RAR, RXR) dans le cerveau adulte (**Tableau III**). Les techniques d'immunorévélation révèlent un taux élevé de ces récepteurs, chez le rat et la souris, dans le striatum, où les isoformes RAR $\beta$  et RXR $\gamma$  sont les plus abondantes (Krezel et al. 1999; Zetterstrom et al. 1999; Moreno et al. 2004). Yamagata et al. en 1993 ont montré que l'isoforme RAR $\beta$  est la plus exprimée dans le cerveau mature de rat, principalement dans le cortex cérébral, le cervelet et le striatum et est présente à des taux très bas dans l'hippocampe. Par la suite, les transcrits de l'isoforme RAR $\beta$  ont été détectés dans l'hippocampe (Chiang et al. 1998;

*Etchamendy et al. 2001*). Néanmoins, dans cette structure, les récepteurs RAR $\alpha$ , RAR $\gamma$  et RXR $\beta$  ont été majoritairement identifiés (*Krezel et al. 1999; Moreno et al. 2004*).

Il est à noter que la localisation de ces protéines n'est pas toujours corrélée avec la distribution des transcrits correspondants, données révélées par une technique d'hybridation *in situ* (*Krezel et al. 1999*). Ceci suggère une régulation post-transcriptionnelle de ces récepteurs, qui contribue à leur localisation spécifique dans le cerveau.

### **Tableau III :** Répartition des récepteurs de l'acide rétinoïque dans le système nerveux central.

*D'après (Lane and Bailey 2005).*

Location of retinoid binding proteins and receptors in the adult CNS<sup>a</sup>

Protein	Adult location
CRBP-I	Dendritic layers of hippocampus and hippocampal nuclei, dentate gyrus, layer five cortical neurones, walls of cerebral blood vessels, meninges, choroid plexus, ependymal cells, tanocytes, glial elements, neurones in glomerular layer of the olfactory bulb, medial amygdaloid nucleus, and hypothalamic nuclei ( <i>Zetterstrom et al., 1994, 1999</i> )
CRABP-I	Striatum, glomerular layer and inner granular layer of the olfactory bulb, olfactory nerve, cells clustered near hypothalamus ( <i>Zetterstrom et al., 1994, 1999</i> )
RAR $\alpha$	Olfactory bulb, particularly the glomerular layer, tenia tecta, indusium griseum, cingulate, frontal and parietal cortex, hippocampal fields CA1, 2 and 3, amygdaloid basolateral and lateral nuclei, thalamus, cerebellar lobules, pons, pituitary, choroid plexus and laminae IV–X of the spinal cord ( <i>Krezel et al., 1999</i> )
RAR $\beta$	Caudate/putamen and both shell and core of nucleus accumbens, arcuate hypothalamus and dorsomedial hypothalamic nucleus, solitary tract and area postrema and rostroventrolateral reticular nucleus of the medulla oblongata, and pituitary gland ( <i>Krezel et al., 1999</i> )
RAR $\gamma$	Low levels detected in most diencephalic and rhombencephalic regions especially the hippocampus ( <i>Krezel et al., 1999</i> )
RXR $\alpha$	Low levels detected ( <i>Krezel et al., 1999</i> )
RXR $\beta$	Ubiquitous distribution but very little protein detected ( <i>Krezel et al., 1999</i> )
RXR $\gamma$	Caudate/putamen and shell and core of nucleus accumbens, hypothalamus, pituitary ( <i>Krezel et al., 1999</i> )

<sup>a</sup> Table summarizes protein distribution of retinoid binding proteins and receptors. Gene expression data are not included.

### 3.3 Quelques gènes cibles des rétinoïdes

De très nombreux gènes (plus de 500 connus à ce jour) voient leur niveau d'expression régulé, directement ou non, par l'acide rétinoïque (*Balmer and Blomhoff 2002*). Parmi eux figurent de nombreux gènes impliqués dans le développement embryonnaire, la vision, la différenciation cellulaire, l'hématopoïèse ou encore l'immunité... (*Maden et al. 1998; Wagner et al. 2002; Drager 2006*). Ainsi, la liste des gènes régulés par l'AR révèle l'étendue de son action et permet d'envisager des rôles physiologiques très larges (**Tableau IV**). Dans le cerveau, un grand nombre de gènes cibles de l'AR codent pour des protéines impliquées dans des fonctions cérébrales majeures comme la plasticité synaptique (neurogranine et neuromoduline), la croissance nerveuse (NGF, facteurs de croissance TrkA et TrkB), ou encore la synthèse de neurotransmetteurs (enzymes Acétylcholine transférase, Tyrosine hydroxylase...). Des études menées *in vitro* ont également mis en évidence la régulation de gènes codant pour des protéines impliquées dans certaines pathologies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson ou la maladie d'Alzheimer. On peut citer par exemple les gènes codant pour les protéines Tau (MAPT), BACE, APP, PS1. La présence dans le cerveau adulte des protéines impliquées dans le métabolisme et le système de réponse de l'AR conforte l'idée selon laquelle la vitamine A joue un rôle essentiel

dans les fonctions cérébrales (McCaffery *et al.* 2006). Les récepteurs nucléaires de la vitamine A présentent une distribution cérébrale spécifique et sont capables d'induire la transcription de nombreux gènes cibles qui interviennent dans des processus primordiaux.

**Tableau IV :** Exemples de gènes régulés par l'acide rétinoïque. D'après Lane et Bailey (2005)

Gene	Effect of RA	Cell system	Assay
Retinoid-regulated neuronal genes <sup>a</sup>			
Gene	Effect of RA on expression	Cell system	Assay
Transporters			
Norepinephrine transporter	↑	PC12, SCG	mRNA, function
Vesicular ACh transporter	↑	PC12, SN56, NG108	mRNA
Vesicular GABA transporter	↑	P19	mRNA
Metabolic enzymes			
Choline acetyltransferase <sup>P</sup>	↑	PC12, SN56	mRNA, protein, activity
		NG108-15, SCG	
Tyrosine hydroxylase	↓	SCG	mRNA, activity
Dopamine β-hydroxylase	↓	SCG	Activity
Glutamic acid decarboxylase	↑	P19, NE-7C2	mRNA
ACh esterase	↑	P19	mRNA
G-protein coupled receptors			
Mu opioid receptor	↓/↑	SH-SY5Y	mRNA
Delta opioid receptor	↑	NG108-15	mRNA
Kappa opioid receptor	↓	P19	mRNA
5-HT <sub>1A</sub> receptor	↑	SN-48	mRNA
Dopamine D2 receptor <sup>V</sup>	↑	Striatum	mRNA, protein
Dopamine D2, D1, D5 receptors	↑	NT2	mRNA, function
Ionotropic receptors			
Nicotinic AChR α3,α4,β2	↑	P19	mRNA, protein
NMDA receptor (NR1)	↑	NG108-15	mRNA
Kainate receptor (GluR6)	↑	P19	mRNA
GABA <sub>A</sub> receptor γ2	↑	P19	mRNA, function
Ion transport proteins			
K <sup>+</sup> channel (Kir 2.1)	↑	SH-SY5Y, SK-N-BE	mRNA, function
Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> exchanger	↑	P19	mRNA, activity
L-type Ca <sup>2+</sup> channel	↑	NG108-15, NT2	mRNA, function
N-type Ca <sup>2+</sup> channel	↑	NT2	mRNA, function
Cytoskeletal proteins			
Neurofilament (-L,-M,-H) proteins	↑	P19	mRNA, protein
Dystrophin-associated proteins	↑	P19	mRNA
Tenascin	↑	SH-SY5Y	Protein
Integrin α/β	↑	SH-SY5Y	Protein
Intracellular signalling molecules			
Phospholipase A2, C, D	↑	LA-N-1	Activity
Arachidonic acid	↑	SK-N-BE	Activity
Neuronal nitric oxide synthase	↑	SN56	mRNA, protein, activity
Tissue transglutaminase	↑	SCG, SK-N-BE, SH-SY5Y	Activity, mRNA
Neuromodulin (GAP 43)	↑	Striatum	
Neurogranin (RC3) <sup>V</sup>	↑	SK-N-BE, striatum	mRNA

Gene	Effect of RA on expression	Cell system	Assay
Neuron-specific enolase <sup>P</sup>	↑	N-115, PC12	mRNA
Calbindin-D 28K	↑	PC12, D283	mRNA, protein
Synapsins I, II, III	↑	NT2	mRNA
Miscellaneous			
Gonadotropin-releasing hormone <sup>V</sup>	↓/↑	GT1-1, hypothalamus	mRNA
Oxytocin <sup>V</sup>	↑	Neuro2A	mRNA
Trk A/Trk B	↑	NB, P19	mRNA
Nerve growth factor	↑	PC12	mRNA
Neural cell adhesion molecule	↑	P19, LA-N-5	Protein
Presenilin 1	↑	SH-SY5Y	mRNA
Presenilin 2	↑	P19	mRNA
Apolipoprotein E	↓	NT2	mRNA
Amyloid protein precursor (APP) <sup>P</sup>	↑	P19, SH-SY5Y, PC12, hippocampus	mRNA, protein
Microtubule-associated protein tau (MAPT) <sup>P</sup>	↑	P19	mRNA

## II Vitamine A et vieillissement

L'augmentation du nombre de personnes âgées en Europe (17% de la population générale en 2008, 30% en 2060) est un phénomène démographique majeur ayant pour conséquence sanitaire un accroissement des maladies liées à l'âge.

Généralement plus lente et plus tardive que le déclin des autres fonctions physiologiques, l'atteinte des fonctions cérébrales a des répercussions plus importantes (*Lindeboom et al. 2004*). C'est pourquoi l'identification des altérations neurobiologiques responsables des déficits mnésiques du sujet âgé constitue un objectif majeur des recherches actuelles sur le vieillissement.

### 1. Hypoactivité de la voie de signalisation des rétinoïdes au cours de l'âge

#### *Au niveau métabolique :*

Les données générales concernant les conséquences du vieillissement sur le métabolisme des nutriments et en particulier sur celui de la vitamine A sont plus descriptives qu'explicatives (*Russell 2000*). Globalement, les études montrent une perturbation du métabolisme de la vitamine A au cours du vieillissement et ceci malgré un stock hépatique important de rétinol chez les sujets âgés (*van der Loo et al. 2004*).

Cette augmentation des réserves hépatiques traduirait des perturbations métaboliques (*Hollander and Dadufalza 1990*) qui expliqueraient la hausse du rétinol sérique observée chez les personnes âgées après un repas (*Borel et al. 1998*).

Les données concernant l'évolution du taux de rétinol plasmatique au cours du vieillissement sont contradictoires ; certains auteurs montrent que la concentration en rétinol sérique varie peu avec l'âge (*Hallfrisch et al. 1994; Dawson et al. 2000; Feart et al. 2005*), pour d'autres elle diminue (*van der Loo et al. 2004*) ou au contraire augmente (*Johnson et al. 1992; Herberg et al. 1994; Borel et al. 1998; Borel et al. 1998*). Par ailleurs, l'activité de certaines

enzymes du métabolisme du rétinol est modifiée (Yamamoto *et al.* 2000) et le transport post-prandial de la vitamine A de l'intestin vers le foie est retardé (Borel *et al.* 1998). Les capacités du sujet âgé à mobiliser ses réserves hépatiques de rétinol sont également fortement affaiblies (Azais-Braesco *et al.* 1995). Enfin, il a été mis en évidence un déclin de la quantité de rétinol au niveau du lobe frontal avec l'âge (Craft *et al.* 2004).

#### *Au niveau nucléaire :*

Les troubles métaboliques de la vitamine A au cours du vieillissement se traduisent par une biodisponibilité réduite en AR entraînant une baisse du niveau d'activité de sa voie de signalisation. Ainsi, une baisse de l'expression de certains récepteurs nucléaires de l'AR (RARs, RXRs) a été observée dans le foie (Pallet *et al.* 1997) et dans le cerveau d'animaux âgés et plus particulièrement dans la structure hippocampique (Enderlin *et al.* 1997; Etchamendy *et al.* 2001). L'administration d'AR permet de rétablir un niveau d'expression des récepteurs nucléaires comparable à celui mesuré chez des animaux jeunes, cette normalisation pouvant être bloquée par la co-administration d'un antagoniste des récepteurs RAR (Enderlin *et al.* 1997; Etchamendy *et al.* 2001; Feart *et al.* 2005). Par ailleurs, une étude menée chez l'Homme a permis de mettre en évidence une diminution significative des RAR $\gamma$  avec l'âge dans les cellules mononuclées du sang (PBMC pour Peripheral Blood Mononuclear Cells) (Feart *et al.* 2005).

## **2. Conséquences fonctionnelles sur la plasticité synaptique et la mémoire**

Aujourd'hui, un ensemble de données de la littérature suggèrent l'existence d'un lien entre le niveau d'activité de la voie de la vitamine A et les altérations de plasticité synaptique au cours du vieillissement.

On entend par "plasticité synaptique", la capacité que possède une région cérébrale à modifier son organisation synaptique, soit à la suite d'une lésion pour suppléer la déficience introduite, soit à la suite de modifications des conditions extérieures (Meunier 1994). Les modifications de la plasticité synaptique peuvent se traduire électrophysiologiquement par les phénomènes "Hebbien" de potentialisation à long terme ou PLT et de dépression à long terme ou DLT. La PLT peut être définie comme une augmentation de l'efficacité de la transmission synaptique induite par l'application d'un train de stimuli de haute fréquence (revue dans Malenka 1994; Pasinelli *et al.* 1995). La DLT, elle, est définie par une limitation de l'efficacité synaptique qui participerait à l'élimination synaptique. Au plan biochimique, le niveau d'expression des protéines RC3 (neurogranine) et GAP43 (neuromoduline) reconnues comme étant de bons indicateurs de la plasticité synaptique permet également de caractériser les modifications d'organisation synaptique. La régulation par l'AR de l'expression des gènes codant pour ces protéines a été montrée à plusieurs reprises *in vivo* (Enderlin *et al.* 1997; Grummer *et al.* 2000; Etchamendy *et al.* 2001; Feart *et al.* 2005). Par ailleurs, un élément de réponse à l'AR a été identifié dans le promoteur du gène codant pour RC3 (Iniguez *et al.* 1994).

Une étude réalisée chez des souris, dont les gènes codant pour les récepteurs RAR $\beta$  et RAR $\beta$ -RXR $\gamma$  ont été supprimés, a révélé une altération de la PLT dans l'hippocampe ainsi qu'un déficit d'apprentissage spatial (Chiang *et al.* 1998). Des études menées *in vivo* chez des



animaux âgés font également apparaître, que l'hypoexpression des récepteurs nucléaires des rétinoïdes induit la baisse d'expression des protéines RC3 et GAP43 (ARNm et protéines), traduisant ainsi un déficit de plasticité synaptique qui participe au déclin cognitif observé chez l'animal âgé. Une altération de la PLT a également été observée chez les animaux âgés. L'hypoexpression de RC3 et GAP43 est particulièrement importante dans l'hippocampe, structure du cerveau très impliquée dans la mémoire relationnelle. Un traitement par l'AR, métabolite actif des rétinoïdes, qui normalise l'expression des récepteurs nucléaires et des gènes cibles codant pour RC3 et GAP43, supprime presque totalement le déficit de PLT lié à l'âge ainsi que les déficits de mémoire relationnelle chez ces mêmes animaux âgés (Enderlin *et al.* 1997; Etchamendy *et al.* 2001; Feart *et al.* 2005). Une supplémentation nutritionnelle prolongée en vitamine A permet chez ces mêmes animaux de prévenir des déficits mnésiques caractéristiques du vieillissement, que ce soit en mémoire à long terme ou en mémoire de travail (Mingaud *et al.* 2008). Des troubles spécifiques de mémoire de travail ont également été observés chez des animaux mutés pour le gène RXR $\gamma$  ou ayant une mutation à la fois sur le gène RAR $\beta$  et RXR $\gamma$  (Wietrzych *et al.* 2005).

**L'ensemble de ces données conforte l'idée d'un rôle essentiel de la vitamine A dans les processus neurobiologiques et cognitifs du cerveau adulte. Par ailleurs, nous avons mis en évidence que l'hypoactivité de sa voie de signalisation participe aux altérations mnésiques qui apparaissent au cours du vieillissement. Il est dans ce cas possible d'envisager que certaines atteintes de la mémoire survenant avec l'âge appartiennent à une catégorie de modifications fonctionnelles générées par une baisse de l'expression des récepteurs nucléaires, associées au vieillissement, et susceptibles d'être compensées par l'administration d'un « traitement adapté ».**

Une autre approche réalisée chez des animaux carencés en vitamine A permet de mieux comprendre le rôle des rétinoïdes dans le cerveau adulte. Ce modèle de « KO nutritionnel » permet de générer très spécifiquement une baisse d'activité de la voie de signalisation de la vitamine A comparable à celle observée chez les animaux âgés.

### **3. Modèle nutritionnel de carence vitaminique A**

La carence en vitamine A chez le rat ou la souris s'accompagne dans le cerveau, d'une diminution de l'expression des récepteurs RAR $\beta$  et RXR $\beta\gamma$ . Cette diminution qui a également été observée dans l'hippocampe et le striatum est normalisée suite à une administration d'AR (Enderlin *et al.* 2000; Etchamendy *et al.* 2003; Husson *et al.* 2003; Husson *et al.* 2004).

#### **3.1 Conséquences fonctionnelles sur la plasticité cérébrale et la mémoire**

Plusieurs données ont mis en évidence des modifications de la plasticité synaptique chez l'animal carencé en vitamine A. Des souris carencées pendant 12 semaines développent des troubles de la PLT. Ces atteintes sont corrigées par la prise d'une alimentation supplémentée en vitamine A (Misner *et al.* 2001).

L'induction dirigée (carence en vitamine A) d'une hypoexpression de la voie de signalisation des rétinoïdes comparable à celle qui préexiste chez l'animal âgé entraîne, dans le cerveau entier et l'hippocampe des animaux adultes, une hypoexpression de RC3 et les mêmes déficits cognitifs que ceux liés au vieillissement (Enderlin et al. 2000; Etchamendy et al. 2003; Husson et al. 2003). Ainsi, les variations de teneurs en certaines protéines, consécutives à l'hypoactivité de la voie des rétinoïdes, telles que celles observées chez l'animal âgé ou l'animal carencé en vitamine A, pourraient être à l'origine d'altérations neurobiologiques associées au vieillissement mnésique. Cependant, contrairement à ce qui a été observé chez les animaux âgés, la réactivation partielle de cette voie de signalisation par l'administration de son ligand ne permet pas de récupération fonctionnelle chez les animaux carencés. Nous avons mis en évidence que le statut thyroïdien, également altéré chez les animaux carencés en vitamine A serait dans ce cas un facteur limitant de la fonctionnalité de la vitamine A (Husson et al. 2003).

Une autre étude a mis en évidence que la carence en vitamine A chez le rat entraîne des altérations de neurogenèse hippocampique associées à l'apparition de déficits d'apprentissage et de mémoire spatiale révélés en piscine de Morris, déficits qui disparaissent après le traitement par l'AR (Bonnet et al. 2008). La neurogenèse hippocampique est une nouvelle forme de plasticité cérébrale impliquée dans les fonctions mnésiques (Schinder et al. 2004; Snyder et al. 2005; Aimone et al. 2006; Leuner et al. 2006; Kitabatake et al. 2007). Ce phénomène peut être brièvement défini comme l'ensemble des processus qui conduisent à l'intégration fonctionnelle de nouveaux neurones dans les circuits cérébraux. Plusieurs études *in vitro* ont montré que l'AR intervient dans différentes étapes de cette neurogenèse (Wohl et al. 1998; Takahashi et al. 1999; Wang et al. 2005; Jacobs et al. 2006). L'AR favoriserait la formation et la croissance des dendrites (Wu et al. 1998; Corcoran et al. 1999). Un traitement des cellules souches hippocampiques de rats par l'AR, induit leur différenciation en neurones et s'accompagne d'une augmentation de l'expression de récepteurs aux neurotrophines tels que le TrKA, TrKB et le P75NTR (Takahashi et al. 1999), neurotrophines qui induisent la croissance neuritique de cellules hippocampiques (Labelle and Leclerc 2000).

Des résultats similaires ont été obtenus par d'autres auteurs qui ont montré que des déficits d'apprentissage et de mémoire spatiale associés à une carence vitaminique A sont corrigés par une supplémentation en vitamine A (Cocco et al. 2002).

### **Conclusion**

***Un ensemble de données soulignent l'importance de la baisse d'activité de l'action cellulaire de la vitamine A dans les altérations de la plasticité cérébrale et des performances mnésiques au cours du vieillissement. Cette relation a été renforcée par les données obtenues sur un modèle nutritionnel de carence en vitamine A. Ce modèle d'hypoactivité de la voie de signalisation des rétinoïdes induit des perturbations du fonctionnement cérébral notamment une altération de la plasticité cérébrale (plasticité synaptique et neurogenèse) ainsi que des déficits d'apprentissage et de mémoire comparables à ceux observés au cours du vieillissement cérébral. Des données plus récentes suggèrent aussi l'implication des rétinoïdes dans le vieillissement pathologique notamment dans « l'étiologie » de la maladie d'Alzheimer. L'ensemble de ces arguments sera décrit dans le chapitre suivant après une présentation non exhaustive de cette maladie.***

### III Rétinoïdes et processus neurodégénératifs : liens avec la MA

#### 1. La maladie d'Alzheimer (MA)

Au début du 20<sup>ème</sup> siècle, la démence du sujet âgé était considérée par la majorité des psychiatres comme liée à l'usure normale du temps. Un médecin allemand, Alois Alzheimer, exposa en 1906 au cours d'une conférence le cas clinique d'une de ses patientes de 51 ans, Auguste D., souffrant d'une altération progressive de ses capacités de compréhension et de mémoire, d'hallucinations, de confusion mentale et d'une inaptitude psychosociale (Alzheimer 1906; Maurer et al. 1997). A l'examen post-mortem, le cerveau de cette patiente a révélé deux types de lésions corticales : des enchevêtrements de fibrilles intracellulaires nommées dégénérescences neurofibrillaires et des « petits foyers caractérisés par l'accumulation d'une substance particulière » nommés depuis plaques amyloïdes (Glennner et al. 1984; Masters et al. 1985).

Aujourd'hui, cette maladie se définit comme une affection dégénérative du cerveau qui associe des troubles prédominants de la mémoire, des troubles cognitifs et/ou du comportement ayant un retentissement sur la vie quotidienne des patients. En effet, elle conduit à une perte de l'autonomie et des fonctions intellectuelles plongeant les patients dans l'isolement. Cette démence dont l'étiologie est encore mal connue, est associée à des lésions histologiques caractéristiques qui la définissent : les plaques amyloïdes (pathologie A $\beta$ ) (Masters and Beyreuther 1987; Glennner 1989) et les dégénérescences neurofibrillaires (pathologie Tau) (Wischik et al. 1988).

##### 1.1 Données épidémiologiques

La Maladie d'Alzheimer (MA) est la pathologie neurodégénérative la plus fréquente. Elle affecterait plus de 25 millions de personnes dans le monde (dont la moitié dans les pays occidentaux où l'âge moyen de la population est élevé) avec 4.6 millions de nouveaux cas chaque année (Ferri et al. 2005). En France, en 2007, on estimait à 860 000 personnes le nombre de personnes atteintes d'Alzheimer ou de maladies apparentées. Selon l'étude PAQUID, la MA touche plus de femmes que d'hommes puisqu'au delà de 75 ans, les proportions sont de 13,2 % pour les hommes et de 20,5 % pour les femmes. Au-delà de 85 ans, la prévalence s'accroît de manière exponentielle avec une proportion de 25 % de sujets atteints (Ramaroson et al. 2003). L'incidence s'élève à 225 000 nouveaux cas par an en France et l'espérance de vie après l'apparition des symptômes est en moyenne de 8,5 ans. Le niveau de dépendance est très variable et actuellement 40 % des patients sont pris en charge dans une institution, ce qui signifie que 60 % des sujets atteints restent à la charge des familles. L'enjeu majeur des recherches actuelles est au minimum de retarder l'apparition de la pathologie de 5 ans ce qui diminuerait de 50% le poids socio-économique de cette maladie.

##### 1.2 Facteurs génétiques et environnementaux

La maladie d'Alzheimer est une affection polyfactorielle qui résulte de l'interaction entre un terrain génétique et des facteurs de l'environnement (Gatz et al. 2006). L'implication des gènes dans la maladie d'Alzheimer est double : d'une part, il existe des formes monogéniques exceptionnelles, caractérisées par un début précoce (avant 65 ans) et par l'atteinte d'un sujet

sur deux à chaque génération (formes autosomiques dominantes) ; d'autre part, dans les formes de loin les plus courantes dites sporadiques, des facteurs de risque génétique (polymorphismes de l'ADN) constituent simplement un « terrain » génétique favorisant une vulnérabilité à la maladie (Rossor *et al.* 1996; Chai 2007).

### 1.2.1 Les formes monogéniques à transmission mendélienne autosomique dominante

Il s'agit de formes à début précoce, avant 65 ans, pour lesquelles des mutations ont été caractérisées. Entre 1991 et 1995, trois gènes responsables des formes familiales de la maladie d'Alzheimer ont été identifiés. Il s'agit du gène de la protéine APP (Amyloid Precursor Protein) situé sur le chromosome 21 dont les mutations concernent 15% de l'ensemble des formes monogéniques (**Tableau V**), des gènes de la préséniline 1 (PS1 sur le chromosome 14) (Campion and Hannequin 2006) et de la préséniline 2 (PS2 sur le chromosome 1) qui représentent 20 à 60 % des formes monogéniques (Hardy 1997; Price *et al.* 1998). Les mutations sont à pénétrance complète, ce qui signifie que les porteurs développent inexorablement la maladie et ce autour de 55 ans en moyenne (Chai 2007).

**Tableau V** : Principales mutations identifiées pour l'APP

Mutation APP	Modification	Références
London mutation	V717I	Goate <i>et al.</i> 1991
Indiana mutation	V717F	Murrell <i>et al.</i> 1991
Swedish mutation	M671L	Mullan <i>et al.</i> 1992
Artic mutation	E693G	Nilsberth <i>et al.</i> 2001
Duplication APP		Rovelet-Lecrux <i>et al.</i> 2006

### 1.2.2 Les formes sporadiques

Elles représentent 99 % des cas et sont associées à des facteurs de risque dont plusieurs ont été reconnus comme l'âge, le sexe ou encore le style de vie, les prises médicamenteuses, et l'alimentation (Dartigues *et al.* 2002).

#### L'âge et le sexe

L'âge est le principal facteur de risque (Evans *et al.* 1989; Kukull and Bowen 2002) avec une incidence qui double par tranche d'âge de 5 ans au-delà de 65 ans (étude PAQUID 2003). Les femmes ont également un risque plus élevé que les hommes de développer la maladie particulièrement après l'âge de 80 ans. Cette différence sexuelle pourrait s'expliquer par des différences génétiques et hormonales notamment liées à la baisse du niveau d'œstrogènes

avec l'âge chez la femme ou simplement par la différence de longévité entre hommes et femmes.

### L'allèle de la protéine ApoE

Le gène de l'apolipoprotéine E (ApoE) se présente sous trois allèles majeurs dans la population générale :  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$ ,  $\epsilon 4$ . Les études de Roses (Roses 1994; Roses et al. 1994) ont montré que les porteurs de l'allèle  $\epsilon 4$  étaient surreprésentés dans la population des malades Alzheimer puisqu'il passe de 5% à 20% environ. Ceci a été confirmé par de nombreuses équipes (Corder et al. 1993; Rebeck et al. 1993; Saunders et al. 1993; Strittmatter et al. 1993). L'allèle  $\epsilon 4$  semble donc un facteur de risque de la MA.

### Les antécédents familiaux

Plusieurs études ont mis en évidence un risque accru de MA chez les sujets ayant un parent au premier degré atteint de cette pathologie. Le risque relatif a été estimé entre 2 et 4 par rapport aux sujets n'ayant pas d'antécédents familiaux.

### Les facteurs vasculaires

L'hypertension artérielle (Skoog et al. 1996; Launer et al. 2001), l'hypercholestérolémie (Kivipelto et al. 2001) et les accidents vasculaires cérébraux (Henon et al. 1998; Desmond et al. 1999; Altieri et al. 2004) sont associés à un risque accru de démence. Le diabète majorerait d'un facteur proche de 2 le risque de survenue de la maladie (Knopman et al. 2001; Xu et al. 2004). Le traitement de l'hypertension artérielle pourrait entraîner une réduction importante de l'incidence de la maladie (Forette et al. 1998; Forette et al. 2002; Tzourio 2007). Une étude récente réalisée par l'équipe de Roriz-Cruz et al. (2007) présentée lors de la conférence internationale sur la MA (Chicago 2008) montre que les personnes atteintes du syndrome métabolique (obésité abdominale, hypertension artérielle, hyperglycémie et haut niveau de triglycérides) ont un risque augmenté de 35% de développer une démence.

### Facteurs environnementaux

#### -Le niveau d'éducation et la stimulation cognitive

Il existe une association entre un niveau bas d'éducation et un risque accru de la MA (Letenneur et al. 1999). Acquérir un haut niveau d'éducation pourrait différer la dégradation des capacités intellectuelles en permettant des phénomènes de compensation mnésique lors du développement des symptômes habituels de la maladie.

Fabrigoule (2002) a également montré que la pratique d'activités comme le jardinage, les voyages, le bricolage ou le tricot est également associé à un risque moindre de MA et de démence en général. En effet, la nécessité de planifier les tâches pourrait constituer un entraînement et permettre au sujet de maintenir ses capacités et de retarder l'apparition de la démence. Ces données rejoignent les résultats d'études récentes qui ont mis en évidence que la pratique de la marche ou du sport pourrait être associé à un risque moindre de développer une démence (Abbott et al. 2004; Podewils et al. 2005).

-Statut matrimonial et environnement social

L'existence de liens entre risque de démence ou MA et statut matrimonial ou réseau social ont été mis en évidence (Helmer et al. 1999). Les sujets célibataires ou vivant seuls ont un risque double de développer une démence, comparés à ceux qui vivent en couple, et un faible réseau social accroît également le risque de démence de 60 % (Helmer et al. 1999; Fratiglioni et al. 2000). La stimulation cognitive, au sein du couple ou d'un réseau social plus développé, protégerait, ou retarderait la phase clinique de la démence.

-Facteurs nutritionnels et hormonaux

Les données épidémiologiques actuelles sont en faveur d'un rôle protecteur de certains nutriments dans la prévention du déclin cognitif (Luchsinger and Mayeux 2004). Des études ont montré que des apports élevés en vitamine C, vitamine E, flavonoïdes, acides gras polyinsaturés (consommation de poissons de la série n-3) ; des concentrations élevées de vitamine B12 et folates ; et de faibles apports en graisses totales sont associés à une diminution du risque de MA ou de déclin cognitif (Engelhart et al. 2002; Morris et al. 2002). Une consommation modérée de vin pourrait également avoir un effet neuroprotecteur sur la survenue d'une démence ou de la MA (Orgogozo et al. 1997). Le rôle antioxydant de certains composants du vin, notamment les polyphénols (Singh et al. 2008) comme le resveratrol protégerait de la MA (Barberger-Gateau et al. 2002; Luchsinger et al. 2004; Wang et al. 2006). Enfin, concernant la vitamine A, peu d'études d'observations existent mais une plus faible prévalence de la maladie serait observée chez des populations consommant des aliments à forte teneur en vitamine A (Hendrie et al. 2001; Casadesus et al. 2007).

1.3 Les anomalies morphologiques

La maladie d'Alzheimer est caractérisée principalement par deux types de lésions : (i) les plaques amyloïdes formées d'une accumulation progressive et irréversible d'un peptide de 40 ou 42 acides aminés, principalement le peptide  $A\beta_{1-40}$  ou  $A\beta_{1-42}$  (ii) les dégénérescences neurofibrillaires provoquées par l'accumulation et l'hyperphosphorylation de la protéine tau, protéine requise pour la polymérisation des microtubules (Nussbaum and Ellis 2003). Les plaques amyloïdes qui sont observées au cours du vieillissement normal et les dégénérescences neurofibrillaires qui sont parfois observées dans d'autres démences dégénératives type Trisomie 21 ou dégénérescences fronto-temporales ne sont pas spécifiques de la maladie d'Alzheimer (Delacourte et al. 2000; Buee et al. 2001; Lee et al. 2004; Sergeant et al. 2005). C'est leur association chez un même patient qui est caractéristique de la MA. Cette concomitance conduit à la formation des plaques séniles qui seraient à l'origine de pertes neuronales et synaptique graduelles dans le cerveau des patients, entraînant la perte des fonctions associées aux régions cérébrales atteintes telles que les troubles progressifs de la mémoire, du comportement, de la parole et des mouvements (Kawas 2003).

1.3.1 Les plaques amyloïdes

Le peptide  $A\beta$ , agent majoritaire constitutif des plaques amyloïdes, est un produit de la dégradation de la protéine APP, l'Amyloid Precursor Protein (Glennner et al. 1984; Masters et

*al.* 1985; Selkoe 2001). L'APP est une protéine transmembranaire exprimée de façon ubiquitaire dans l'organisme jouant plusieurs rôles physiologiques en particulier dans les cellules du système nerveux central. Elle est exprimée majoritairement au niveau des synapses neuronales et elle est connue pour jouer un rôle dans la croissance neuritique ainsi que dans la formation des synapses (Kamal *et al.* 2000; Priller *et al.* 2006). Son expression est augmentée pendant la différenciation neuronale et après atteinte de l'intégrité neuronale. Des rôles dans la signalisation cellulaire, la potentialisation à long terme ou encore l'adhésion cellulaire ont été également suggérés (*voir pour revue* Turner *et al.* 2003; Zheng *et al.* 2006). Les souris KO pour le gène APP sont viables et développent relativement peu de signes phénotypiques associés (troubles de la PLT et perte de mémoire) sans aucune perte neuronale générale (Zheng *et al.* 1995). Par ailleurs, les souris transgéniques surexprimant l'APP présentent des troubles de la PLT (Chapman *et al.* 1999). Un autre rôle récemment découvert est celui de l'implication de l'APP et de l'A $\beta$  dans la régulation du métabolisme du cholestérol et des sphingomyélines par un processus impliquant le clivage de l'APP (Grimm *et al.* 2005). Cette protéine APP existe principalement sous trois formes provenant de l'épissage alternatif de l'ARN messager : l'APP695 (majoritaire dans le cerveau), l'APP751 et l'APP 770. Ces deux dernières formes sont minoritaires mais possèdent un domaine similaire aux inhibiteurs de protéases de la famille Kunitz ne conduisant pas à la formation du peptide A $\beta$ . Elles sont surexprimées au cours du vieillissement physiologique, de la trisomie 21 et de la MA. L'augmentation du rapport APP770-751/APP695 serait un indicateur de la progression de la MA (Johnson *et al.* 1990; Preece *et al.* 2004).

L'APP695 peut subir un clivage selon deux voies : la voie physiologique dite non amyloïdogénique (qui ne conduit pas à la formation du peptide A $\beta$ ) et la voie pathologique dite amyloïdogénique qui conduit à la formation du peptide A $\beta$  toxique constituant des plaques séniles et des dépôts diffus dits dépôts amyloïdes (**Figure 7**).

#### *La voie physiologique : la voie non amyloïdogénique*

Dans les conditions physiologiques, la protéine APP est d'abord clivée par l' $\alpha$  sécrétase au sein du fragment A $\beta$ , ce clivage empêchant la formation de ce peptide. Plusieurs métalloprotéases de la famille ADAMs (A Disintegrin And Metalloproteases), ADAM9 (Koike *et al.* 1999), ADAM10 (Lammich *et al.* 1999) et TACE (Tumor necrosis factor  $\alpha$ -Converting Enzyme) (Buxbaum *et al.* 1998) seraient dotées de cette activité  $\alpha$ -sécrétase. ADAM10 est actuellement considérée comme la meilleure candidate pour l'activité  $\alpha$ -sécrétase neuronale comme le reflète l'expression coordonnée et colocalisée des ARNm d'ADAM10 avec ceux d'APP dans le cerveau (Marcinkiewicz *et al.* 2000) ou encore la prévention de l'apparition des plaques lors de sa surexpression dans un modèle de souris de la MA (Postina *et al.* 2004). Ce premier clivage de l'APP par l' $\alpha$  sécrétase entre Lys 16 et Leu 17, génère deux fragments : le fragment N-terminal sAPP $\alpha$  aux propriétés neurotrophiques (Turner *et al.* 2003) et le fragment membranaire C-terminal C83 ( $\alpha$ CTF).

Le fragment C83 peut alors subir un clivage par la  $\gamma$ -sécrétase qui donne deux nouveaux fragments : le P3 aux propriétés encore inconnues et l'AICD facteur de transcription (*von Rotz et al.* 2004; Slomnicki and Lesniak 2008). Cette  $\gamma$ -sécrétase est un complexe multi-protéique composé au minimum des présénilines, de la nicastrine, Aph-1 et Pen-2. Les présénilines

(PS1 et PS2) et la nicastrine seraient responsables respectivement de l'activité  $\gamma$ -sécrétase (Wolfe et al. 1999; Li et al. 2000; Li et al. 2000) et de la reconnaissance du substrat grâce à la présence d'un long domaine extracellulaire. Aph-1 stabiliserait la préséniline dans le complexe tandis que Pen-2 serait nécessaire au clivage endoprotéolytique des présénilines qui confère l'activité catalytique  $\gamma$ -sécrétase ainsi qu'à la maturation de la nicastrine (Steiner et al. 2002; Takasugi et al. 2003).

### La voie pathologique : la voie amyloïdogénique

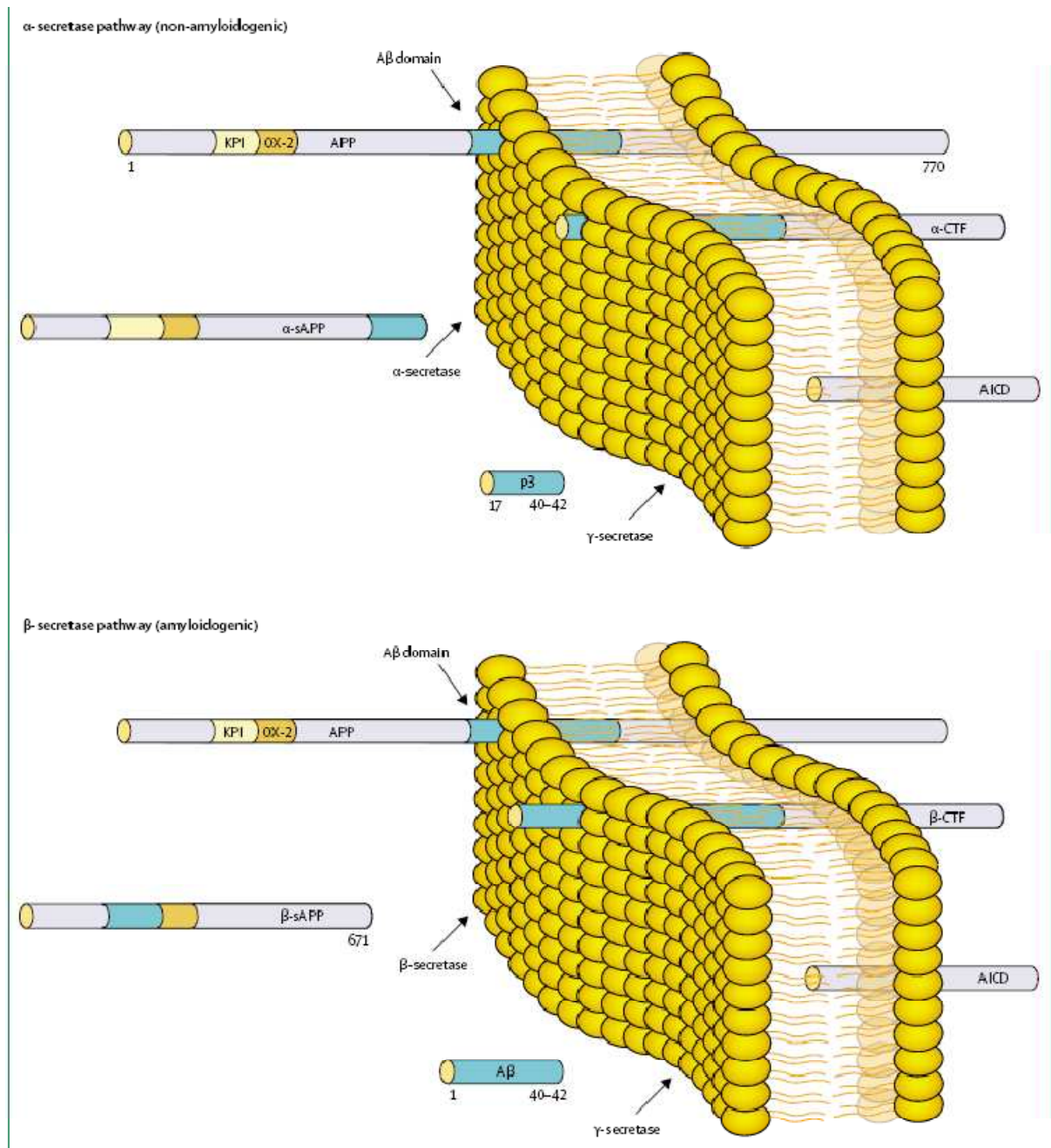
Selon cette voie, la protéine APP est clivée dans un premier temps par la  $\beta$ -sécrétase nommée BACE conduisant à la synthèse d'un fragment soluble le sAPP $\beta$  plus court que le sAPP $\alpha$  et d'un fragment C terminal C99 contenant la totalité du peptide A $\beta$ . Ce fragment C99 subit un second clivage par la  $\gamma$ -sécrétase et libère le peptide A $\beta$  ou peptide amyloïde dans le milieu extracellulaire. On distingue de manière simplifiée le peptide A $\beta$  sous deux formes : la forme longue de 42 acides aminés (A $\beta$ 42) et la forme courte de 40 acides aminés (A $\beta$ 40). Dans les formes familiales de maladie d'Alzheimer, il y a une surproduction de la forme A $\beta$ 42 qui est plus neurotoxique, probablement du fait de sa localisation intracellulaire et de sa plus grande capacité à s'agréger que l'A $\beta$ 40 (Haass et al. 1998; Yan and Wang 2007).

Plusieurs hypothèses existent décrivant les mécanismes par lesquels les peptides A $\beta$  pourraient induire une neurodégénérescence dans la MA (Crouch et al. 2008). Ainsi, les peptides A $\beta$  pourraient inhiber l'activité mitochondriale (Crouch et al. 2007), la transmission synaptique (Walsh et al. 2002; Klyubin et al. 2005), le transport axonal (Wirhth et al. 2006; Wirhth et al. 2007) ou encore en altérant l'intégrité membranaire (Tickler et al. 2005; Tickler et al. 2005) ou en générant du stress oxydatif (Opazo et al. 2002). Des données récentes suggèrent que ce sont les oligomères solubles d'A $\beta$  qui seraient des effecteurs de la perte synaptique hippocampique (Walsh et al. 2002; Shankar et al. 2007).

Dans les conditions normales, A $\beta$  est dégradé par les peptidases IDE (insulin degrading enzyme), neprylisine et par l'endotheline converting enzyme (Carson and Turner 2002). Leal et al. (2006) montrent chez un modèle transgénique de souris Tg2576 une augmentation corticale des niveaux protéiques d'IDE qui est alors colocalisé avec les dépôts A $\beta$ .

Dans la MA, une surproduction du peptide amyloïde associé à un dérèglement de la balance entre les deux voies est observée : la voie amyloïdogénique est privilégiée.





**Figure 7 :** La voie amyloïdogénique et non amyloïdogénique (d'après *Blennow et al. 2006*)

### 1.3.2 Les dégénérescences neurofibrillaires :

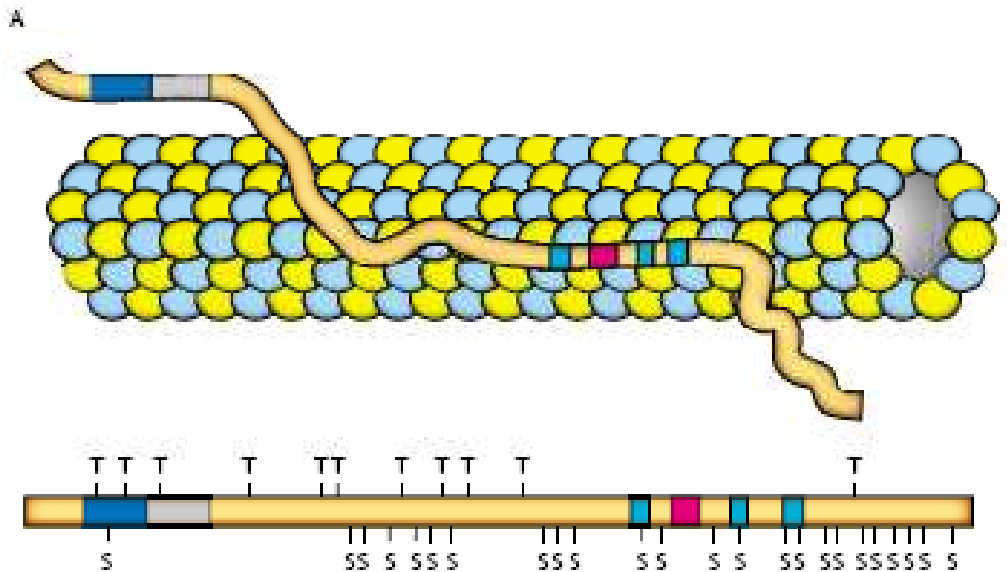
Les DNF correspondent à une accumulation intraneuronale de fibrilles formées de filaments très caractéristiques appelés paires de filaments appariés en hélice ou PHF (*paired helical filaments*) (*Kidd 1963; Kosik et al. 1986; Wood et al. 1986*). Ces PHF sont constituées d'agrégats de protéines microtubulaires tau anormalement phosphorylées (*Grundke-Iqbal et al. 1986; Ihara et al. 1986; Flament et al. 1989; Greenberg et al. 1992; Delacourte et al. 2000*).

Tau est une protéine axonale qui se lie aux microtubules à travers des domaines de liaison spécifiques et permet l'assemblage et la stabilisation du microtubule (*Weingarten et al. 1975*) (**Figure 8**). Les protéines Tau régulent la stabilité des microtubules en fonction de leur état de

phosphorylation, de nombreux résidus Sérine et Thréonine seraient présents sur la protéine Tau, trente ont été identifiés en utilisant des anticorps monoclonaux anti-phospho tau (Hasegawa *et al.* 1992; Morishima-Kawashima *et al.* 1995; Takahashi *et al.* 1995; Lovestone *et al.* 1997; Roder *et al.* 1997; Paudel *et al.* 1999). Six isoformes de protéines Tau ont été isolées des PHF dans lesquelles des sites de phosphorylations ou des conformations non physiologiques spécifiques ont été révélés par plusieurs anticorps tels qu'AP422, AT100, MC1, TG-3 (**Tableau VI**). L'hyperphosphorylation de Tau survenant dans la MA commence à l'intérieur de la cellule, entraîne la séquestration de tau normal et d'autres protéines associées aux microtubules ce qui cause un désassemblage des microtubules et une déstabilisation du cytosquelette. Le transport axonal est alors perturbé ce qui altère les fonctions neuronales et synaptiques. Les protéines tau hyperphosphorylées vont ensuite s'agréger sous la forme de filaments appariés en hélice (PHF) pour former des enchevêtrements qui vont endommager globalement toutes les fonctions neuronales (Delacourte *et al.* 2000; Hamdane *et al.* 2003).

**Tableau VI** : Sites de phosphorylations spécifiques des PHF retrouvés dans la MA

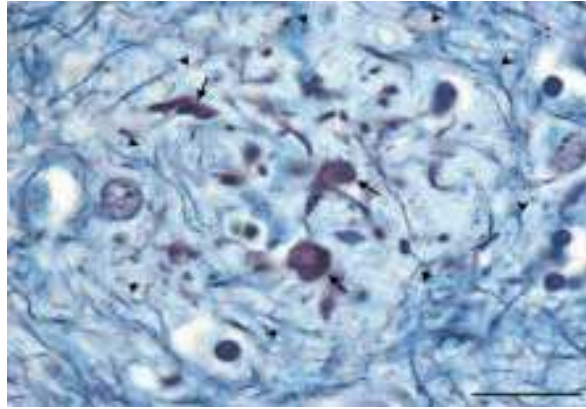
<b>Anticorps</b>	<b>Résidus phosphorylés ou conformation</b>	<b>Références</b>
<b>AT100</b>	Thr 212 + Ser 214	<i>Mailliot et al. 1998</i> <i>Delobel et al. 2002</i> <i>Gotz et al. 2001</i>
<b>AP422 ou R145</b>	Ser 422	<i>Bussière et al. 1998</i> <i>Benneceb et al. 2000</i> <i>Gotz et al. 2001</i>
<b>MC1</b>	Epitope conformationnel ALZ50	<i>Gotz et al. 2001</i> <i>Whitman et al. 2001</i> <i>Sharrani et al. 2006</i>
<b>TG3 ou M4</b>	Thr 231 et Ser 235	<i>Hamdane et al. 2003</i> <i>Chen et al. 2005</i>



**Figure 8 :** La protéine Tau associée aux microtubules par les résidus thréonine (T) et serine (S) soumis à l'action des kinases et phosphatases. (D'après *Blennow et al. 2006*)

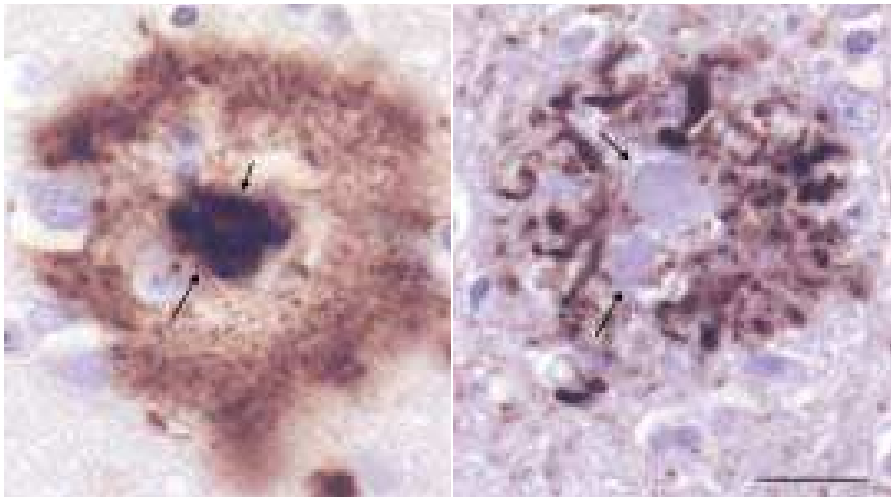
Chez le patient Alzheimer, les dégénérescence neurofibrillaires se déclinent en trois types de lésions : (i) les dégénérescences neurofibrillaires dans le corps cellulaire des neurones, (ii) les fibres tortueuses qui sont des prolongements nerveux courts (majoritairement des dendrites mais aussi des axones) présents dans le neuropile et (iii) la couronne des plaques séniles (*Brion et al. 1985*).

La plaque sénile appelée plaque neuritique par opposition à la plaque diffuse dite amyloïde constituée uniquement de dépôts  $A\beta$  est une lésion extracellulaire composite constituée dans son centre d'un dépôt de peptide  $A\beta$  (majoritairement la forme longue  $A\beta_{42}$  neurotoxique) issu de la protéine APP et en couronne de prolongements (issus principalement des neurones) chargés en protéines tau (**Figure 9**). De très nombreux composés comme l'Apolipoprotéine E et l'Apolipoprotéine D ou encore des microglies activées ont été décrits au sein ou à proximité de la plaque sénile (*Itagaki et al. 1989; Frautschy et al. 1998; Matsuoka et al. 2001*). ApoD serait colocalisée avec les plaques amyloïdes compactes dans le cortex temporal de patients atteints de la MA (*Desai et al. 2005*). La présence de microglies activées accompagnée de celle d'astrocytes serait due à la présence de dépôts d' $A\beta$  (*Meda et al. 2001; Rozemuller et al. 2005*). Ce phénomène est caractéristique d'un processus inflammatoire, ces deux monocytes ayant pour rôle la protection des neurones du SNC inaccessibles aux cellules immunitaires classiques. Durant la neuroinflammation, ces cellules produisent des radicaux libres attaquant ainsi les composantes cellulaires (protéines, ADN, ...) entraînant la mort neuronale et libèrent des molécules inflammatoires (Interleukines IL-1 et IL-6) altérant la transmission synaptique (*Walsh and Aisen 2004*).



### Plaque sénile

La préparation a été mise en contact avec des ions argent, puis avec un révélateur photographique. Cette technique révèle les axones. La plaque sénile est délimitée par des têtes de flèche. Les flèches indiquent des axones dégénérés dans la couronne de la plaque sénile. Barre = 20  $\mu$ m.



### Plaque sénile avec ses 2 principaux composants

**A :** Un échantillon de cortex cérébral provenant d'un patient affecté par la maladie d'Alzheimer a été mis en contact avec un anticorps, révélé en marron et dirigé contre le peptide A $\beta$ . Les flèches indiquent le coeur amyloïde de la plaque sénile.

**B :** Dans le même échantillon, un anticorps anti-tau met en évidence la couronne de la plaque sénile constituée d'axones dégénérés (cf image du haut). Le coeur amyloïde n'est pas marqué par l'anticorps (flèches) et apparaît en bleu.

Barre = 20  $\mu$ m.

© Charles Duyckaerts. Laboratoire de Neuropathologie Escourolle, La Salpêtrière, 2006.

**Figure 9 :** La plaque sénile (tiré du livre vert de la MA, 2006)

### 1.3.3 Rapports chronologiques entre plaques amyloïdes et DNF

Un siècle après la découverte d'Alois Alzheimer, la question de l'importance des plaques amyloïdes par rapport aux dégénérescences neurofibrillaires (DNF) reste posée. Quelle lésion est la cause, laquelle est la conséquence ? Il a été montré un lien direct entre DNF, troubles cognitifs et symptômes associés à la MA (Delacourte 2001). Des données récentes suggèrent que les oligomères solubles d'A $\beta$  y seraient également associés (Walsh et al. 2002; Shankar et al. 2007).

Les dégénérescences neurofibrillaires ou DNF s'installent progressivement dans les différentes aires cérébrales d'une manière séquentielle et hiérarchisée. L'envahissement du tissu cérébral s'effectue selon la séquence : région hippocampique (aires transentorhinale, entorhinale, hippocampique) qui est la plus vulnérable du cerveau, puis extension dans le cortex temporal (pôle temporal, cortex temporal inférieur puis temporal moyen). A ce stade, le processus dégénératif est encore infraclinique et peut le demeurer plusieurs dizaines d'années. La phase clinique définie par l'apparition des symptômes survient avec l'atteinte des régions corticales associatives (temporal supérieur, cortex préfrontal et cortex pariétal). En fin d'évolution, les lésions envahissent l'ensemble du cortex et de nombreux noyaux sous-corticaux (Braak and Braak 1991; Braak et al. 2006). L'extension progressive des DNF induit une perte neuronale et une atteinte des systèmes de neurotransmetteurs observée dans plusieurs noyaux sous-corticaux. C'est le cas en premier lieu du noyau basal de Meynert (baisse de l'acétylcholine) à l'origine de l'innervation cholinergique du cortex cérébral (Arnold et al. 1991). La déplétion de ce neuromédiateur a été à l'origine de « l'hypothèse cholinergique », hypothèse qui fonde le traitement par des inhibiteurs centraux de l'acétylcholinestérase (Akasofu et al. 2008; Pakaski and Kalman 2008; Sugimoto 2008). D'autres noyaux comme le locus coeruleus (noradrénaline), les noyaux du raphé (sérotonine) et à un moindre degré la substantia nigra (dopamine) sont atteints par les DNF. La topographie des DNF est un indice de l'évolution de la pathologie de la région hippocampique vers les régions néo-corticales (Delacourte and Buee 2000; Alafuzoff et al. 2008). Concernant la pathologie amyloïde, les plaques apparaissent d'abord dans le cortex, puis dans l'hippocampe et enfin s'étend aux noyaux du diencephale et au striatum (Thal et al. 2000; Thal et al. 2002; Alafuzoff et al. 2009). Six stades d'évolution de la MA au niveau neuropathologique ont été décrits (Braak and Braak 1997), stades qui correspondent à une progression de la pathologie au travers des différentes régions cérébrales. D'après les études *post mortem*, la séquence pourrait être la suivante : les premières lésions à apparaître sont les DNF de la région hippocampique. Des dépôts diffus de peptide A $\beta$  sont ensuite observés dans le néocortex. Ils deviennent amyloïdes et provoquent une réaction microgliale et l'apparition des fibres tortueuses, de la plaque sénile et des DNF. Les mécanismes de compensation liés à la plasticité neuronale sont saturés ce qui entraîne l'apparition des signes cliniques (Jacobsen et al. 2006). Ces données montrent que les pathologies A $\beta$  et tau agissent en synergie. Un certain nombre de données suggèrent qu'A $\beta$  interagirait avec tau en accélérant la formation des DNF (Zheng et al. 2002; Blurton-Jones and Laferla 2006). Les dépôts diffus de peptide A $\beta$  ne provoquent pas à eux seuls de détérioration intellectuelle alors qu'il existe un lien entre DNF et déficit cognitif (Bierer et al. 1995).

### 1.3.4 L'atrophie cérébrale

L'atrophie cérébrale est la troisième grande caractéristique de la MA observable chez tous les patients atteints de la MA mais non suffisante pour établir le diagnostic. Chez ces patients, le cerveau peut perdre 8 à 10% de son poids tous les 10 ans alors que chez les sujets sains cette perte n'est que de 2%. Dans la MA, l'atrophie siège de manière précoce dans la région temporale médiane et touche en particulier l'hippocampe, une structure du système limbique impliquée dans la mémoire et la représentation spatiale, et s'accompagne d'une dilatation des ventricules cérébraux et des sillons corticaux (Uylings and de Brabander 2002; de Leon et al. 2004). L'hippocampe joue un rôle important dans le traitement et le stockage de la mémoire à long terme. Chez des sujets à risque génétique mais sans signe clinique, la rapidité d'évolution de l'atrophie dans cette région hippocampique reste un indice prédictif d'évolution effective vers la maladie (Enzinger et al. 2005; Jagust et al. 2008; Oberg et al. 2008).

### 1.4 Les symptômes, diagnostic et stades de la MA

Les symptômes associés à la MA sont caractérisés par des troubles cognitifs spécifiques ainsi que des troubles comportementaux généralement contemporains aux troubles cognitifs. La fonction cognitive la plus précocement touchée dans la MA est la mémoire épisodique (Lowndes and Savage 2007) (oubli des souvenirs autobiographiques) puis la mémoire de travail (difficulté à planifier et réaliser des tâches multiples), et par la suite une amnésie rétrograde (perte progressive des capacités de récupération des souvenirs anciens) qui isole le patient de son environnement (Kawas 2003). La mémoire procédurale n'est altérée que dans les stades avancés de la maladie. Ces troubles de la mémoire sont associés à des troubles du langage ainsi qu'à une atteinte des fonctions exécutives (planification, réalisation des gestes courants) qui ont un impact majeur sur l'autonomie du sujet (Perry and Hodges 1999; Mickes et al. 2007). Les symptômes comportementaux représentent une des manifestations majeures de la MA. Dans les formes modérées à tardive de la maladie, il est observé des troubles émotionnels dont l'expression peut se manifester selon les individus sur le mode dépressif ou au contraire euphorique. Par ailleurs, une agitation et une agressivité excessive, signes d'anxiété, constituent des troubles du comportement fréquemment retrouvés chez les patients atteints de la MA. Dans les stades les plus avancés de la maladie, des troubles psychotiques tels que hallucinations, idées délirantes et troubles de l'identification rendent très difficile la fin de vie des patients.

Les différents stades de la démence peuvent être évalués par les professionnels de santé à l'aide d'une échelle de dégradation des capacités des patients. Il s'agit de la « Global Deterioration Scale » (GDS) encore nommée échelle de Reisberg décrivant sept stades du déclin cognitif dans la MA (Tableau VII).

**Tableau VII :** Sept stades décrivant le déclin des capacités cognitives (Global Deterioration Scale (DTS, échelle de Reisberg))

<b>Stade 1</b>	<i>Pas de déficit cognitif</i>	<i>Aucun problème quotidien</i>
<b>Stade 2</b>	<i>Déclin cognitif très léger</i>	<i>Oubli de noms et emplacements d'objets Difficultés à trouver des mots</i>
<b>Stade 3</b>	<i>Déclin cognitif léger</i>	<i>Difficultés à aller dans de nouveaux lieux, à résoudre de nouveaux problèmes</i>
<b>Stade 4</b>	<i>Déclin cognitif modéré</i>	<i>Difficultés dans des tâches complexes (finances, planification)</i>
<b>Stade 5</b>	<i>Déclin cognitif modérément sévère</i>	<i>Besoin d'assistance pour le choix des vêtements, pour réaliser la toilette</i>
<b>Stade 6</b>	<i>Déclin cognitif sévère</i>	<i>Aide nécessaire pour s'habiller, pour la toilette</i>
<b>Stade 7</b>	<i>Déclin cognitif très sévère</i>	<i>Vocabulaire limité Incapacité à s'asseoir, à marcher, à sourire</i>

### 1.5 Les modèles d'études (et leurs limites)

C'est l'association des plaques amyloïdes et des dégénérescences neurofibrillaires chez un même patient qui est caractéristique de la MA, maladie éminemment complexe et spécifiquement humaine pour laquelle il n'existe pas de modèle animal qui reproduise complètement la pathologie humaine. Aujourd'hui, il existe de nombreux modèles de souris transgéniques dans lesquels ont été introduits des gènes humains sauvages ou mutés codant pour des protéines impliquées dans la MA. On peut les regrouper en deux catégories : les modèles de la pathologie amyloïde d'une part et les modèles de la pathologie Tau d'autre part.

Concernant la première catégorie, les premiers animaux transgéniques mis au point pour modéliser la MA surexpriment le gène de l'APP (*Kawabata et al. 1991; Wirak et al. 1991; Games et al. 1995*). Par la suite, des croisements ont été réalisés entre des lignées surexprimant APP et des lignées surexprimant PS1 ayant pour conséquence une accélération de l'apparition de la pathologie amyloïde avec une augmentation du ratio A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 (*Borchelt et al. 1996; Borchelt et al. 1997; Holcomb et al. 1998; Chishti et al. 2001*). Parallèlement, la mise au point de modèles transgéniques mutés au niveau de l'ApoE croisés avec des lignées surexprimant APP montre que selon l'allèle exprimé, la protéine ApoE peut avoir un rôle neuroprotecteur (allèles  $\epsilon$ 2 et  $\epsilon$ 3) ou au contraire accélérer le phénomène de neurodégénérescence associé à la MA (allèle  $\epsilon$ 4) (*Holtzman et al. 2000; Lanz et al. 2003; Mann et al. 2004*).

Concernant les modèles de la pathologie Tau, la surexpression de l'isoforme humaine sauvage chez la souris entraîne une hyperphosphorylation de tau mais sans développement de DNF (Gotz et al. 1995; Spittaels et al. 1999; Gotz et al. 2001). C'est pourquoi les chercheurs ont mis au point des modèles animaux où tau pathogène est exprimé. La lignée de souris transgéniques P301L développe une pathologie neurofibrillaire progressive et une perte neuronale associée (Gotz et al. 2001).

L'avance importante en matière de modèle de la MA est apportée par Oddo et ses collaborateurs qui en 2003 ont développé un modèle dit de « Laferla » illustrant de manière combinée la pathologie amyloïde et la pathologie Tau (Oddo et al. 2003). Ces souris sont triples transgéniques possédant les mutations de l'APP (Swedish), PS1 (M146V) et tau (P301L). Ces animaux développent des plaques dans le néocortex (à environ 3 mois) puis dans l'hippocampe à l'âge de 6 mois. Les DNF apparaissent après l'apparition de la pathologie amyloïde d'abord au niveau de l'hippocampe (à 12 mois) puis envahissent le cortex. Les souris présentent également un dysfonctionnement synaptique incluant des déficits de PLT, qui précède la formation des plaques et des DNF (Oddo et al. 2003). Cette lignée est actuellement considérée comme celle simulant de la manière la plus proche le développement de la pathologie de la MA chez l'homme.

**Les limites de ces modèles transgéniques soulèvent l'idée de la nécessité de mettre au point un modèle qui prenne en compte les aspects environnementaux et en particulier l'alimentation, facteur auquel l'individu est exposé tout au long de sa vie. Un ensemble de données de la littérature plaide aujourd'hui en faveur de l'implication de la baisse de biodisponibilité de la vitamine A dans l'apparition de la MA.**

## 2. Hypofonctionnement de la voie des rétinoïdes et Maladie d'Alzheimer

### 2.1 Données épidémiologiques

Un ensemble de données de la littérature suggèrent une modification du taux de rétinol sérique chez les patients atteints de la MA. Une diminution a été observée chez les patients présentant une démence (Gackowski et al. 2008) et plus spécifiquement chez les patients atteints de la MA (Bourdel-Marchasson et al. 2001; Rinaldi et al. 2003).

Les recommandations nutritionnelles actuelles laissent supposer qu'un apport élevé en  $\beta$  carotène protégerait du déclin cognitif (Grodstein et al. 2007) notamment chez des personnes possédant l'allèle  $\epsilon 4$  de la protéine ApoE (Gillette Guyonnet et al. 2007).

Ces données épidémiologiques sont confortées par des données génétiques qui renforcent l'hypothèse de l'implication des rétinoïdes dans l'étiologie de la MA.

### 2.2 Données génétiques

Des études originales ont mis en évidence une colocalisation des gènes impliqués dans la MA avec ceux codant pour les récepteurs à l'AR (RARs et RXRs) et pour les protéines de transport et de métabolisation des rétinoïdes (Goodman 2006). Parmi les loci chromosomiques, ceux qui sont le plus associés à la MA sont le locus 10q23 et le locus 12q13



(Nowotny *et al.* 2005; Liang *et al.* 2006; Lin *et al.* 2006). Il a été montré des liens génétiques forts entre RBP4 (protéine de transport du rétinol), CYP26A1 et CYP26C1 (enzymes d'inactivation de l'AR) et le locus 10q23-3 (Bertram *et al.* 2000; Abraham *et al.* 2001; Ait-Ghezala *et al.* 2002) d'une part et entre RAR $\gamma$ , 5 des rétinaldéhydes déshydrogénases et le locus 12q13 d'autre part. Ainsi, l'hypothèse de cet auteur est que cette colocalisation génique suggérerait un cluster de gènes activés en même temps qui coordonnerait la régulation génétique ou épigénétique par un mécanisme opéron-like appelé chromeron. Des mutations rares des récepteurs aux rétinoïdes associés à une biodisponibilité affaiblie en acide rétinoïque pourrait déréguler des gènes candidats de la MA présent dans le mode chromeron selon la disponibilité en AR.

### 2.3 Données cellulaires et moléculaires

Une première étude a mis en évidence la présence de plaques amyloïdes dans les vaisseaux cérébraux de rats soumis à une carence en vitamine A pendant un an (Corcoran *et al.* 2004). Ces plaques sont consécutives à une diminution de l'expression des récepteurs RAR $\alpha$  et de l'enzyme « choline acétyl transférase » gène cible des rétinoïdes responsable de la synthèse d'Acétylcholine. Ces mêmes auteurs ont mis en évidence *post mortem* une diminution de l'expression du récepteur RAR $\alpha$  dans les neurones et les vaisseaux méningés du néocortex ainsi qu'une hypoexpression de la RALDH2 chez des patients atteints de la MA.

Par ailleurs, une étude *in vitro* suggère que l'AR protège les neurones hippocampiques d'une apoptose induite par le peptide amyloïde  $\beta$  (Sahin *et al.* 2005).

Une dernière étude très récente montre chez des souris transgéniques APP/PS1 qu'un traitement par l'AR atténue d'une part le dépôt de peptides A $\beta$  dans le cortex frontal et l'hippocampe et d'autre part diminue la phosphorylation des protéines Tau via l'inactivation de la cdk5, principale kinase impliquée dans les DNF. L'AR rétablit également les déficits de mémoire et d'apprentissage spatial chez ces animaux et limite la perte neuronale associée à une baisse de l'activation des microglies (Ding *et al.* 2008).

**Ces données confortent l'idée de l'implication des rétinoïdes dans l'étiologie de la MA et des études *in vitro* ont mis en évidence que l'expression d'un ensemble de gènes impliqués dans des processus conduisant à la MA est régulée par l'AR. Un élément de réponse RARE a été identifié dans le promoteur d'un certain nombre d'entre eux impliqués entre autres dans le processus amyloïdogène et les dégénérescences neurofibrillaires (Tableau VIII).**

#### 2.3.1 Vitamine A et voie amyloïdogénique

Des études *in vitro* ont mis en évidence que le gène codant pour la protéine précurseur du peptide A $\beta$  (APP) est régulé positivement par l'AR (König *et al.* 1991; Fukuchi *et al.* 1992; Fahrenholz 2007). L'administration sous cutanée d'AR pendant 10 jours chez des rats âgés (22-23mois) entraîne une réduction de l'expression de la protéine APP dans l'hippocampe (Pan *et al.* 1993). Chez des souris transgéniques APP/PS1, l'AR préviendrait la formation d'APP-CTFs, produits du clivage d'APP par la BACE (Ding *et al.* 2008). L'AR protégerait ainsi des mécanismes de formation du peptide A $\beta$ .

D'autres données obtenues *in vitro* montrent que des enzymes clés de la voie amyloïdogénique BACE, PS1 et PS2 sont également régulées positivement par l'AR (Hong *et al.* 1999; Satoh *et al.* 2000; Flood *et al.* 2004). Enfin ADAM10, la sécrétase impliquée dans la voie physiologique, possède dans son promoteur un élément de réponse aux récepteurs de l'AR (Prinzen *et al.* 2005).

Dans la cellule, le peptide A $\beta$  peut être dégradé par des enzymes assurant sa clairance. L'Insulin Degrading Enzyme ou IDE, une métalloprotéase responsable de la dégradation de l'insuline, est un candidat majeur de la dégradation de l'A $\beta$  cérébral (Song and Hersh 2005). Cette protéine naturellement sécrétée par les neurones et la microglie clive les monomères A $\beta$ 40 et A $\beta$ 42 mais pas les oligomères stables d'A $\beta$  (Vekrellis *et al.* 2000). Chez les patients atteints de la MA, une diminution des taux des ARNm et des protéines ainsi que de l'activité catalytique d'IDE est observée (Miller *et al.* 1988; Perez *et al.* 2000; Cook *et al.* 2003; Zhao *et al.* 2004; Miners *et al.* 2008).

La présence d'un marqueur lié à IDE au niveau du locus 10q23 fait de lui un gène de susceptibilité majeur de la MA sporadique. Ce locus 10q23 porte également des gènes liés au métabolisme des rétinoïdes notamment la protéine RBP4 transporteur majeur du rétinol dans le sérum ainsi que la protéine Cytochrome P26A1 qui contrôle directement la biodisponibilité de l'AR en dégradant l'isoforme all-trans de l'AR. Dans des cultures de neuroblastomes humains, l'AR activerait l'expression d'IDE (Melino *et al.* 1996) ; un RARE a été identifié dans la région promotrice du gène.

### 2.3.2 Vitamine A et dégénérescences neurofibrillaires

L'AR apparait réguler positivement l'expression de la protéine Tau. En effet, une étude menée *in vitro* a révélé une augmentation du taux des ARNm et de la protéine de Tau (Heicklen-Klein *et al.* 2000; Megiorni *et al.* 2005). L'AR permettrait également d'augmenter le niveau protéique de Tau de 32% dans un modèle cellulaire SH-SY5Y (Jamsa *et al.* 2004). Chez des souris transgéniques APP/PS1, un traitement par l'AR diminue l'activité de la cdk5, principale kinase impliquée dans la phosphorylation de Tau (Ding *et al.* 2008).

### 2.3.3 Protéines de liaison du rétinol associées à la MA

ApoD est une apolipoprotéine membre de la famille des lipocalines. La majorité des protéines de cette famille sont des transporteurs de petits ligands hydrophobes comme le cholestérol, la progestérone ou encore l'acide arachidonique. ApoE, apolipoprotéine majeure du fluide cérébrospinal, sert de transporteur principal des lipides dans le cerveau. Il a été montré qu'ApoD et ApoE participaient en complément de RBP au transport du rétinol et des rétinyles esters dans le cerveau (Norum and Blomhoff 1992; Boerwinkle *et al.* 1994; Goodman 2006) notamment lorsque la concentration en rétinylestères devient trop importante. L'expression d'ApoD est régulée positivement par l'AR *in vitro* (Lopez-Boado *et al.* 1996; Fagan *et al.* 2002). Dans les cellules neuronales, la quantité d'ApoE constitutive est diminuée après traitement par l'AR (Harris *et al.* 2004) tandis que dans des cultures primaires d'astrocytes l'AR active la sécrétion d'ApoE (Cedazo-Minguez *et al.* 2001; Liang *et al.* 2004).

Chez les patients atteints de la MA, des niveaux importants d'ApoD ont été retrouvés dans le liquide céphalorachidien, l'hippocampe et le cortex. ApoD serait colocalisée avec les plaques

amyloïdes compactes dans le cortex temporal de patients atteints de la MA. Elle influencerait l'agrégation du peptide A $\beta$  ou faciliterait la phagocytose et le transport des fibrilles A $\beta$  des plaques vers le système vasculaire cérébral (Desai et al. 2005).

ApoE quant à elle joue un rôle clé dans la réparation neuronale en redistribuant les lipides afin de régénérer les axones et les cellules de Schwann durant la myélinisation et la remyélinisation. Selon l'isoforme, ApoE a des effets positifs (allèle  $\epsilon$ 2 et  $\epsilon$ 3) ou négatifs (allèle  $\epsilon$ 4) sur la croissance des neurites (Huang 2006), sur la mémoire (Raber et al. 1998; Buttini et al. 1999) ou encore sur l'affinité avec les protéines tau hyperphosphorylées présentes dans les DNF (Strittmatter et al. 1994; Tesseur et al. 2000). De nombreuses données ont mis en évidence un lien fort entre la présence de l'allèle  $\epsilon$ 4 et le risque de développer la MA (20% pour la présence d'un seul allèle, 90% pour la présence de 2 allèles  $\epsilon$ 4). L'ApoE  $\epsilon$ 4, qui est le produit de l'allèle  $\epsilon$ 4, semble favoriser l'agrégation du peptide A $\beta$  sous forme de plaques séniles (Moir et al. 1999; Huang 2006).

**L'ensemble de ces données obtenues *in vitro* plaident en faveur d'une relation entre des dysfonctionnements de la voie de signalisation de la vitamine A et ceux de processus biochimiques impliqués dans la MA.**

Tableau VIII : Récapitulatif de gènes cibles de l'AR impliqués dans la MA

Gène	Régulation par l'AR	Liens avec les rétinoïdes	Références
<b>APP</b>	Positive mRNA <i>in vitro</i>	Pas de RARE encore trouvé	<i>Konig et al. 1990; Fukuchi et al. 1992; Fahrenholz 2007</i>
<b>BACE</b>	Positive mRNA dans neuroblastomes <i>in vitro</i>		<i>Satoh and Kuroda 2000</i>
<b>PS1</b>	Positive mRNA cellules SH-SY5Y <i>in vitro</i>		<i>Hong et al. 1999; Flood et al. 2004</i>
<b>PS2</b>	Positive mRNA <i>in vitro</i>		<i>Hong et al. 1999; Culvenor et al. 2000</i>
<b>ADAM10</b>	Positive mRNA <i>in vitro</i>	RARE présent dans son promoteur	<i>Prinzen et al. 2005; Holback et al. 2008</i>
<b>ApoD</b>	Positive mRNA via RAR $\alpha$	Transport rétinol quand [retinyls esters] fortes	<i>Lopez-Boado et al. 1996</i>
<b>ApoE</b>	Positive mRNA	Protéine de transport des rétinylesters	<i>Liang et al. 2004</i>
<b>IDE</b>	Positive protéine <i>in vitro</i> dans neuroblastomes humains		<i>Melino et al. 1996</i>
<b>Tau</b>	Positive mRNA et protéine <i>in vitro</i>		<i>Martin et al. 1995; Hecklen-Klein et al. 2000; Jamsa et al. 2004</i>

## IV Objectifs du travail

Un ensemble des données de la littérature rapporte aujourd'hui l'implication de la baisse d'activité de la voie de signalisation de la vitamine A dans la genèse des altérations de la plasticité synaptique et des déficits mnésiques spécifiques associés au vieillissement. Par ailleurs, des travaux récents suggèrent l'implication probable de cette même voie de signalisation dans les processus neurodégénératifs caractéristiques de la maladie d'Alzheimer. En effet, des dysfonctionnements de l'action cellulaire de la vitamine A semblent impliqués dans les mécanismes biochimiques conduisant à la formation des plaques amyloïdes et des dégénérescences neurofibrillaires et par voie de conséquence des plaques séniles, lésions caractéristiques de cette maladie.

Dans ce contexte, les objectifs de ce travail étaient de mieux comprendre, dans le cerveau, certaines conséquences anatomiques et fonctionnelles d'une baisse d'activité de la voie de signalisation de la vitamine A. Notre approche expérimentale a consisté à utiliser 2 modèles animaux :

- Un modèle de carence vitaminique A (qualifié par certains auteurs de "KO nutritionnel") qui induit spécifiquement une baisse d'activité de sa voie de signalisation,
- Un modèle d'hypothyroïdie dont il a été montré qu'il induit une hypoactivité de la voie de signalisation de la vitamine A.

Ces deux modèles animaux se distinguent de ceux aujourd'hui utilisés pour aborder l'étiologie de la maladie d'Alzheimer qui sont majoritairement des modèles dans lesquels un, deux parfois trois transgènes de protéines clés dans le processus dégénératif (APP, PS1, PS2, ou Tau etc...) sont introduits. Ces modèles de souris transgéniques explorent de façon sélective le rôle d'altérations précises au niveau du génome. Cependant, ils ne permettent pas d'explorer de manière satisfaisante le rôle de facteurs environnementaux tels que la nutrition, dans la genèse d'une vulnérabilité à la maladie et de ce fait leur rôle éventuel dans la prévention de la démence.

Dans la première partie de ce travail de thèse, nous avons suivi les évolutions anatomiques et métaboliques associées à une baisse d'activité de la voie de signalisation de la vitamine A en utilisant des techniques d'imagerie et de spectroscopie haute résolution (High Resolution Magic Angle Spinning). Cette approche originale menée chez l'animal carencé en vitamine A a fait l'objet de la **Publication N° 1: "Vitamin A deficiency in rats induces anatomic and metabolic changes comparable with those of neurodegenerative disorders"** publiée dans *The Journal of Nutrition*. Ghenimi et al., Apr 2009.

Les profondes modifications anatomiques et métaboliques associées au régime carencé en vitamine A, nous ont alors conduit à étudier, par HRMAS, les conséquences d'un traitement par l'AR sur le métabolisme cérébral de rats carencés en vitamine A. Ces résultats apportent la première démonstration de l'existence d'altérations morphologiques et métaboliques cérébrales associées à une carence vitaminique A chez le rat. Ces modifications sont comparables à celles observées dans le cerveau de patients développant des maladies neurodégénératives et renforcent l'idée d'une implication de la baisse d'activité de la voie de signalisation de la vitamine A dans la MA. Par ailleurs, elles démontrent l'effet d'un traitement court par l'AR sur le métabolisme cérébral.

Dans la deuxième partie du travail de thèse, nous avons étudié l'effet d'une carence vitaminique A sur l'équilibre entre les voies physiologique et amyloïdogénique de dégradation de l'APP. Ce travail, qui avait aussi pour objectif de contribuer à la caractérisation du modèle expérimental de carence vitaminique A sur le plan biochimique a fait l'objet d'une publication acceptée et d'une publication en cours de préparation.

**Publication N° 2: Retinoic acid normalizes nuclear receptor mediated hypo-expression of proteins involved in  $\beta$ -amyloid deposits in the cerebral cortex of vitamin A deprived rats.**

*Husson et al. Neurobiology of disease, 2006.*

Les premiers résultats suggèrent que la diminution de l'activité de la voie des rétinoïdes, via la diminution de l'expression des récepteurs nucléaires de l'AR, pourrait contribuer à l'apparition des dépôts amyloïdes à l'origine de la formation des plaques séniles observées dans la MA. Par ailleurs, ce travail a révélé que le modèle de carence en vitamine A qui prétend modéliser la diminution naturelle de la biodisponibilité en vitamine A liée à l'âge, induit dans un premier temps des altérations neurobiologiques et mnésiques semblables à celles observées lors du vieillissement normal, puis si la carence se prolonge, fait basculer les processus vers des dysfonctionnements de types dégénératifs.

Le travail rapporté dans la publication N°3 avait pour objectif de préciser l'état du processus amyloïdogène chez des rats soumis à une carence prolongée.

**Publication N° 3: Vitamin A hyposignalling modulates APP degrading processing.**

*Ghenimi et al., en preparation pour Neurobiology of aging*

L'ensemble des résultats obtenus laisse supposer que la carence vitaminique A favoriserait la voie amyloïdogénique dans le cortex des animaux, sans toutefois modifier le taux de peptide A $\beta$ . La dégradation de la protéine APP selon cette voie semble atténuée par une administration d'AR.

Nos connaissances sur la nature des relations entre les voies de l'AR et de la T3 dans la plasticité synaptique nous ont conduits à penser qu'il est indispensable de ne pas dissocier l'étude des deux voies de signalisation dans la perspective d'une définition d'une stratégie thérapeutique. En effet, les résultats obtenus récemment au laboratoire montrent que la baisse d'activité de la voie de T3 peut devenir un facteur limitant dans l'action cellulaire de l'AR. Par ailleurs, des données de la littérature montrent le rôle des dysfonctionnements thyroïdiens dans les processus générant des dépôts de type  $\beta$ -amyloïdes. Une étude récente a mis en évidence la régulation négative *in vivo* de l'expression du gène codant pour l'APP par les hormones thyroïdiennes (O'Barr et al. 2006). Dans ce travail, ces auteurs suggèrent que l'hypothyroïdie, dont la prévalence augmente avec l'âge et déjà observée chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer, favoriserait les dépôts amyloïdes.

Dans la troisième partie de ce travail de thèse, nous avons étudié les indicateurs présentés précédemment chez des animaux hypothyroïdiens qui présentent une altération concomitante des voies de signalisation de l'AR et de la T3 (métabolite actif des hormones thyroïdiennes). Précisons toutefois que la baisse d'activité de la voie de la T3 est plus prononcée chez les rats hypothyroïdiens que chez les rats carencés en vitamine A.

## CHAPITRE II

# ETUDE DE L'ANATOMIE ET DU METABOLISME CEREBRAL PAR RMN CHEZ LE RAT CARENCE EN VITAMINE A

L'objectif de cette première étude est assez original puisqu'il conjugue un suivi dans le temps de l'évolution des changements morphologiques et métaboliques du cerveau lors d'une carence en vitamine A chez le rat en utilisant des techniques RMN d'imagerie et de spectroscopie haute résolution (High Resolution Magic Angle Spinning). Cette étude a fait l'objet de la **Publication 1 : Vitamin A deficiency in rats induces anatomic and metabolic changes comparable with those of neurodegenerative disorders** : Nadirah Ghenimi, Marie-Christine Beauvieux, Marc Biran, Véronique Pallet, Paul Higuieret, and Jean-Louis Gallis, *Journal of Nutrition Apr 2009, 139 : 696-702*. Ces résultats montrent que la carence en vitamine A entraîne de profondes altérations anatomiques caractérisées par un ralentissement de la croissance cérébrale précédant une réduction du volume du cerveau et de l'hippocampe accompagnée d'une augmentation des espaces ventriculaires. Le profil métabolique est également fortement atteint : des perturbations des marqueurs métaboliques de l'osmorégulation associés à ceux des altérations membranaires confirment une forte dégradation de l'intégrité neuronale.

Des études précédentes avaient montré qu'une administration d'AR a la capacité de compenser les troubles associés à l'hypoactivation de la voie de signalisation des rétinoïdes. En effet, une administration d'AR (150µg/kg) pendant 4 jours permet de réverser l'hypoexpression de certains gènes cibles des rétinoïdes au cours d'une carence en vitamine A (Etchamendy et al. 2001; Etchamendy et al. 2003; Husson et al. 2004) ou du vieillissement (Etchamendy et al. 2001). C'est pourquoi dans une seconde étude, nous avons voulu étudier l'effet d'un traitement par l'AR sur le profil métabolique cérébral de rats ayant une carence restreinte dans le temps en vitamine A (10 semaines de carence au lieu de 14) par HRMAS (High Resolution Magic Angle Spining) du proton. En effet, les premiers signes de carence sont observables à partir de la 10ème semaine de carence, ils sont associés aux premières altérations de plasticité synaptique dans le striatum (Husson et al. 2004). La dose d'AR utilisée a été montrée comme efficace pour réverser l'hypoexpression de la voie de signalisation des rétinoïdes liée l'âge ainsi que les troubles de mémoire associés (Etchamendy et al. 2001). Cette étude a fait l'objet du paragraphe 3 de ce chapitre. Les résultats obtenus révèlent un rôle de l'AR dans la régulation du métabolisme cérébral.

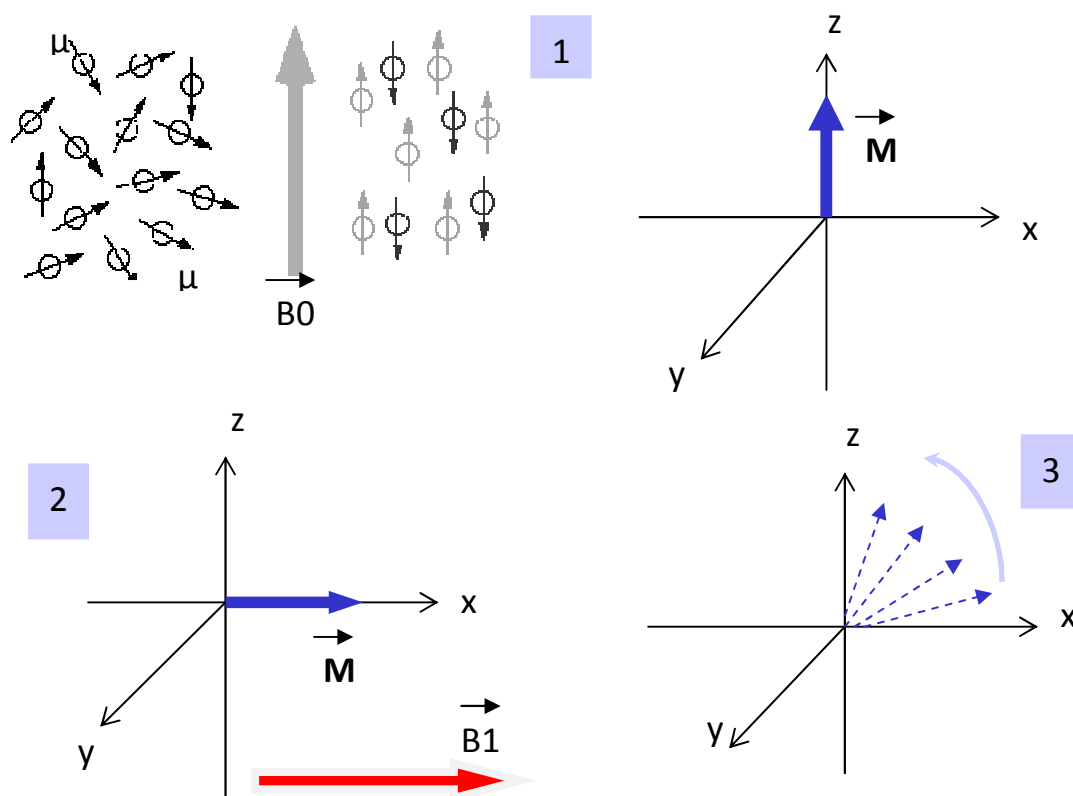
### 3. Résonance magnétique nucléaire ou RMN

#### 3.1 Les Bases de la RMN

La RMN est une méthode physique qui met en jeu les noyaux des atomes. Ces noyaux se comportent comme des aimants microscopiques du fait de leur rotation sur eux-mêmes selon

leur moment magnétique. Chaque noyau est ainsi caractérisé par un moment magnétique de spin ( $\mu$ ) qui est défini par une direction, un sens et une amplitude. En l'absence de champ magnétique, l'orientation de ces moments magnétique est aléatoire. Le spin du noyau d'un atome ou *spin nucléaire* dépend de son nombre de protons et de neutrons : les atomes dont les noyaux sont composés d'un nombre pair de protons et de neutrons possèdent un spin nul. Ainsi, par exemple les noyaux des atomes de carbone 12 (qui possède 6 protons + 6 neutrons) ou d'oxygène 16 (8 protons et 8 neutrons) formes isotopiques les plus stables sont les plus abondantes naturellement, et leur spin nucléaire est nul. En revanche, les noyaux ayant un spin nucléaire différent de zéro, sont « visibles » en RMN. Par exemple, le noyau de l'atome d'hydrogène n'est composé que d'un seul proton, le moment magnétique nucléaire de l'hydrogène est donc celui du proton isolé, à savoir  $s = \frac{1}{2}$ . Comme dans les systèmes biologiques l'hydrogène ( $^1\text{H}$ ) est l'élément le plus abondant, les techniques de RMN du proton trouvent de larges applications de la spectrométrie analytique et quantitative à l'imagerie.

Schématiquement, le principe de la Résonance Magnétique Nucléaire consiste à modifier le moment magnétique nucléaire des noyaux des atomes que l'on souhaite étudier.



**Figure 10** : Les trois étapes de la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)



Elle est caractérisée par trois phases :

### - 1<sup>o</sup> étape : la polarisation

Dans un champ magnétique uniforme  $\vec{B}_0$ , les noyaux sont orientés parallèlement à ce champ et dans les deux sens. Ces deux conformations, parallèle et anti-parallèle, correspondent à deux niveaux d'énergie.

### - 2<sup>ème</sup> étape : la résonance

A la suite de l'application d'un champ électromagnétique  $\vec{B}_1$  perpendiculaire à  $\vec{B}_0$ , oscillant à une fréquence dite fréquence de Larmor caractéristique (radio fréquence spécifique) de la nature du noyau étudié, les différents noyaux, captant cette apport d'énergie changent de niveau énergétique et leurs moments magnétiques basculent dans le sens du champ : c'est le phénomène de résonance.

### - 3<sup>ème</sup> étape : la relaxation

Lors du retour à l'état énergétique d'équilibre initial (phase de relaxation), les noyaux restituent l'énergie sous forme d'un signal électrique dit de précession libre (FID) dans l'échelle du temps. Une opération mathématique appelée transformée de Fourier permet l'obtention de spectres dans l'échelle des fréquences. Ce signal RMN est fonction de l'environnement des tissus étudiés et dépend des temps de relaxation transversaux et longitudinaux des noyaux T1 et T2 (**Figure 1**).

## 1.2 Les techniques RMN: l'imagerie et la spectrométrie

Nous mettons ici à profit deux applications non invasives, sans effets secondaires connus de la RMN : (i) l'imagerie par résonance magnétique (IRM) qui permet d'étudier *in vivo* la morphologie et l'anatomie d'organes, ici le cerveau de rat (Brucker 400, 4,7T) et (ii) la spectrométrie par résonance magnétique (SRM) qui permet classiquement l'analyse du profil métabolique d'un organe ou d'un tissu considéré (minimum 0.5 -1g). La spectrométrie HRMAS est une technique particulière de haute résolution permettant d'analyser des échantillons très petits (20-30mg) dont des biopsies cérébrales congelées (cortex, hippocampe et striatum) (Brucker Avance 500, 11,7T).

### Principe de l'imagerie :

L'IRM est une technique de diagnostic puissante qui fournit des images tridimensionnelles et en coupe de grande précision anatomique. Elle est basée sur la résonance magnétique nucléaire des protons de l'eau contenue dans l'organisme.

L'intensité recueillie pour un élément de volume (voxel) dépend de la concentration et de l'état physico-chimique (donc des temps de relaxation) de l'eau à l'endroit considéré. En effet, grâce à la résonance des protons, le signal va pouvoir être codé dans le temps (FID)

puis transformé dans les trois dimensions de l'espace par Transformation de Fourier et fournir une information de type image.

Selon la méthode utilisée, le contraste entre deux voxels (volumes de mesure) peut être augmenté si les temps de relaxation des spins nucléaires (décrivant le retour à l'équilibre des noyaux après l'excitation) diffèrent dans les deux zones. Il est donc possible d'observer des altérations des tissus (telles que des tumeurs) grâce aux différences de densité et de relaxation des protons de l'eau.

Ici, nous avons utilisé la séquence RARE (Rapid Acquisition with Refocused Echoes : séquence rapide de spin Echo pondérée en T2) qui nous permet de segmenter le cerveau de l'animal (voxel de 4cmX4cm) et d'obtenir des coupes longitudinales et transversales (1mm d'épaisseur). Puis afin d'évaluer le volume hippocampique et cérébral global, nous avons utilisé une séquence FLASH 3D (Fast Low Angle SHot) qui permet une reconstitution globale des voxels étudiés.

### **Principe de la spectrométrie HRMAS :**

La HRMAS ou High Resolution Magic Angle Spinning permet l'étude avec une très haute résolution spectrale de faibles quantités de composés anisotropiques (tissus biologiques, bactéries, ...). Le principe est basé sur la réduction importante de l'interaction dipolaire des moments nucléaires qui participe à une perte de résolution spectrale. Ceci est obtenu par une rotation très rapide de l'échantillon à « l'angle magique » ( $\cos \alpha = 1/3$  soit  $\alpha = 54,7^\circ$ ) formé par le rotor contenant l'échantillon avec la direction du champ magnétique statique  $\vec{B}_0$ .

Cette technique d'analyse présente l'avantage de pouvoir quantifier des métabolites polaires et apolaires en s'affranchissant des altérations liées aux méthodes d'extraction. La faible quantité de matière nécessaire (20mg) permet d'analyser des biopsies des structures cérébrales différenciées (cortex, hippocampe, striatum). Les spectres en HRMAS du proton sont acquis en 13 min pour 20 mg de poids frais. Une résolution spectrale équivalente en SRM dite « classique » sur quelques grammes d'échantillon nécessiterait plusieurs heures d'acquisition.

On obtient alors un spectre RMN où la fréquence (exprimée sous forme de déplacement chimique, en parties par million) de chaque résonance est caractéristique de la nature physico chimique des protons d'un métabolite donné. Pour chaque raie, l'aire du pic de résonance reflète la quantité de métabolite présente dans l'extrait.

Les métabolites observables en spectrométrie peuvent ainsi être détectés dans les structures biologiques à des concentrations inférieures à la millimole par litre.

Pour la quantification relative, les pics de résonance des métabolites d'intérêt biologique sont rapportés à celui de la créatine considérée d'après la littérature comme un invariant. Il existe aujourd'hui des techniques de quantification absolue des métabolites de type Quest ou LC Model assez difficiles de mise en œuvre dans nos conditions expérimentales.

Les données bibliographiques concernant les maladies neurodégénératives permettent de sélectionner quelques métabolites assez spécifiques du métabolisme cérébral : la nature, le rôle et les variations pathologiques de ces métabolites sont résumés ci-dessous (pour revues voir (Govindaraju et al. 2000; Choi et al. 2007; Moffett et al. 2007)).

**-le N Acétylaspartate (NAA) (2,02 ppm)** : c'est un marqueur quantitatif du fonctionnement cérébral spécifique des neurones, de souffrance neuronale. Par conséquent, des niveaux réduits de NAA indiquent une perte de neurone ou un dysfonctionnement neuronal.

**-La Créatine (Cr) (3,01 ppm)** : Elle reflète le métabolisme énergétique du tissu cérébral. Le signal en 1H de la créatine comprend également celui de la phosphocréatine, qui est un composé à haut potentiel d'énergie (intermédiaire entre l'ADP en ATP). Ce paramètre du métabolisme étant considéré comme invariant, elle est généralement utilisée comme référence interne : Les aires des pics de résonances des protons correspondant aux différents métabolites sont rapportées à celle de la Créatine afin de comparer leur évolution.

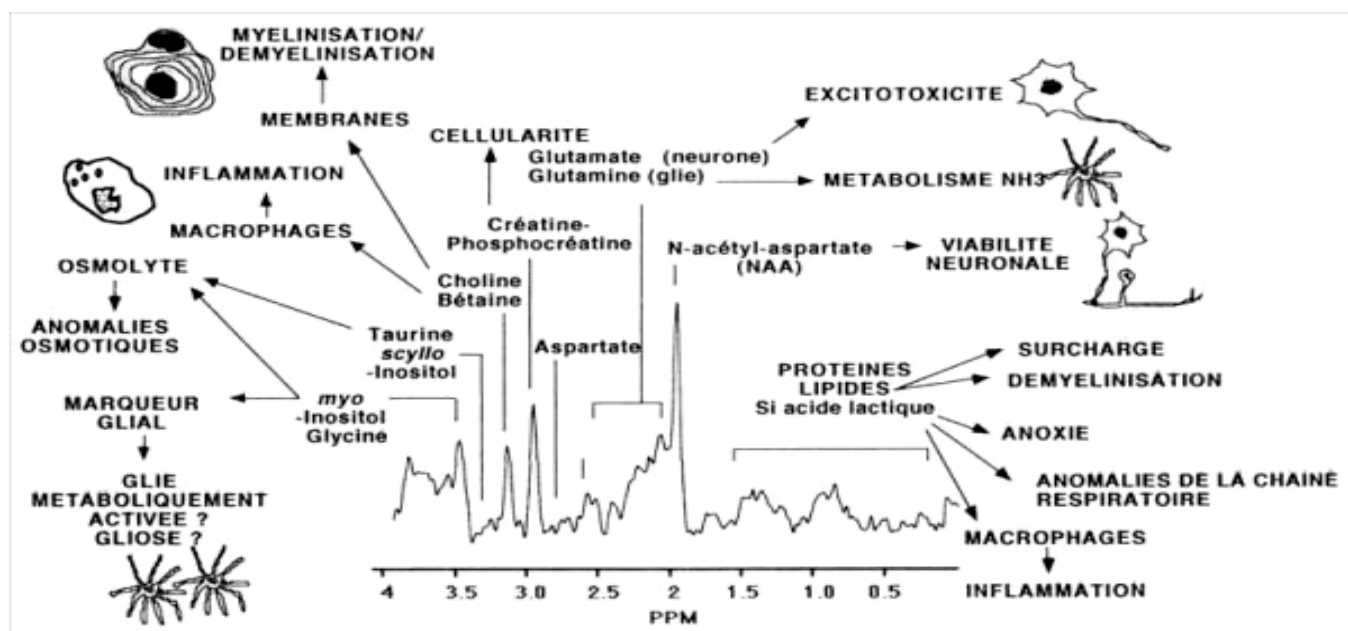
**-La Choline (Cho) (3,22 ppm)** : c'est un marqueur de « souffrance » membranaire. Elle est impliquée (via tous ses dérivés (Phosphatidylcholine...)) dans le métabolisme et la structure des phospholipides membranaires. Ce signal est souvent augmenté dans les processus démyélinisants comme dans la sclérose en plaques ou lors de toute augmentation du turnover membranaire (prolifération cellulaire, mort cellulaire et destruction des membranes).

**-Le Glutamate (Glu) (2,2 ppm)** : c'est un neurotransmetteur d'excitation, il est associé à la glutamine (Gln). Ici, les signaux du Glu et de la Gln ne sont pas distinguables : ils sont notés Glx. Il peut également être utilisé comme source énergétique apporté par les cellules nourricières des neurones : les cellules gliales.

**-La Taurine (Tau) (3,3 ppm)** : c'est un marqueur de stress osmotique ou d'astroglie qui correspond à une augmentation anormale du nombre d'astrocytes due à des pertes neuronales adjacentes. Sa variation traduit généralement une modification de l'osmolarité du tissu considéré.

**-Le Myo inositol (MIns) (3,5 ppm)** : c'est un marqueur de souffrance gliale. Il augmente au cours de processus impliquant une activation gliale ou une gliose. Sa diminution peut-être reliée à des phénomènes d'hyposmolarité.

**-Le Glutathion (Glt ou GSH) (3,77 ppm)** : le glutathion sous forme réduite (GSH) est l'antioxydant majeur des cellules, les protégeant notamment des radicaux libres oxygénés (dérivés actifs de l'oxygène). Lors du vieillissement, une chute accélérée des niveaux de glutathion est observée. De bas niveaux de glutathion sont souvent rencontrés dans plusieurs maladies associées au vieillissement telles les cataractes, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, ...



**Figure 11** : Schéma global de neurochimie cellulaire (Tiré du rapport « Etat de l'art de la spectrométrie in vivo du proton par RMN » de J.M. DIDELOT, L. SIWIEC, 2001)

## 2- Effets d'une carence en vitamine A sur l'anatomie et le métabolisme cérébral chez le rat : approches par IRM et HRMAS

### 2.1 Méthodologie

Des rats mâles Wistar (Harlan, France) ont reçu un régime carencé en vitamine A (0 UI rétinol/g ; Laboratorio Piccionni, Italie) ou un régime témoin (5 UI rétinol/g ; INRA, Jouy en Josas, France) à compter du sevrage et pendant 14 semaines, moment de l'euthanasie. Le poids ainsi que la quantité de nourriture ingérée par chaque rat ont été suivis dans trois groupes expérimentaux:

- Groupe témoin nourri *ad libitum* avec régime témoin : groupe « control » (n=5).
- Groupe carencé nourri *ad libitum* avec le régime carencé : groupe « VAD » (n=5).
- Groupe témoin consommant la même quantité de nourriture que le groupe carencé : groupe « pair-fed » (n=5).

Une étude anatomique a été réalisée par Imagerie de Résonance Magnétique (4,7 Tesla) après 5, 7, 9, 11 et 14 semaines de carence, une étude longitudinale du volume cérébral global ainsi que du volume hippocampique a été effectuée par volumétrie IRM. Au moment du sacrifice à la semaine 14, les cerveaux ont été congelés par *funel freezing* (Ponten et al. 1973) puis disséqués : des échantillons de cortex, d'hippocampe et de striatum sont prélevés. Une étude du profil métabolique de chaque structure a été réalisée par HRMAS à 11,7 Tesla. L'analyse des spectres métaboliques a permis l'étude des quantités relatives (à la Créatine/Phosphocréatine) de marqueurs métaboliques cérébraux: le N Acétyl aspartate

(NAA), marqueur de densité neuronale, la choline (Cho) reflet de l'intégrité membranaire, la Taurine (Tau) indicateur d'osmolarité, ou encore le myoinositol (MIns) marqueur glial.

## 2.2 Principaux résultats

La chute du rétinol sérique dès la 3<sup>ème</sup> semaine de carence proche de la valeur zéro à la 5<sup>ème</sup> semaine de carence valide notre modèle.

Un ralentissement de la croissance du volume cérébral significatif dès la 7<sup>ème</sup> semaine associée à une augmentation des espaces ventriculaires confirme une atteinte du SNC chez les animaux VAD. Cette chute du volume cérébral est corrélée à la baisse de rétinol sérique chez les animaux carencés. Après 14 semaines, le volume cérébral des rats carencés est diminué de 10,3% par rapport aux rats témoins. Concernant le volume hippocampique, une diminution significative est observée à la 11<sup>ème</sup> et 14<sup>ème</sup> semaine de carence atteignant 22% de différence entre le groupe VAD et le groupe contrôle.

L'étude des profils métaboliques révèle également que la carence entraîne de profonds désordres dans chacune des structures cérébrales : une diminution significative du N Acétyl Aspartate [cortex (-36 %), striatum (-22%), hippocampus (-19%)] révélerait une perte neuronale. Une augmentation du MIns dans le striatum et le cortex est retrouvée ce qui est également observé dans les cerveaux de patients atteints de la MA. Une diminution de la Choline (-14%) dans l'hippocampe et une augmentation dans le cortex soulignerait des dérèglements membranaires. Enfin, une diminution de la Taurine (-29%) dans le striatum et une augmentation dans le cortex (+18%) reflèterait des troubles osmotiques prononcés.

Ainsi, dès la 7<sup>ème</sup> semaine de carence, le ralentissement de la croissance cérébrale corrélée au niveau du rétinol sérique et indépendante de la prise alimentaire peut-être considérée comme un marqueur prédictif des troubles cérébraux confirmés à 14 semaines par de profondes atteintes métaboliques.

## 2.3 Conclusion

Ces résultats apportent la première démonstration de l'altération morphologique précoce et de perturbation métaboliques cérébrales profondes associées à une carence vitaminique A chez le rat. Ces modifications sont comparables à celles observés dans les cerveaux de patients développant des maladies neurodégénératives et confortent l'hypothèse selon laquelle une baisse de l'activité de la voie de signalisation de la vitamine A ayant lieu au cours du vieillissement participerait au développement de ces pathologies telles que la maladie d'Alzheimer.

# Publication 1



# Vitamin A Deficiency in Rats Induces Anatomic and Metabolic Changes Comparable with Those of Neurodegenerative Disorders<sup>1</sup>

Nadirah Ghenimi,<sup>2,3</sup> Marie-Christine Beauvieux,<sup>2</sup> Marc Biran,<sup>2</sup> Véronique Pallet,<sup>3</sup> Paul Higuieret,<sup>3</sup> and Jean-Louis Gallis<sup>2\*</sup>

<sup>2</sup>Centre de Résonance Magnétique des Systèmes Biologiques, Unité Mixte de Recherche 5536 Centre National de la Recherche Scientifique-Université Bordeaux 2, F-33076 Bordeaux Cedex, France; and <sup>3</sup>Unité de Nutrition et Neurosciences-Institut des Sciences et Techniques des Aliments de Bordeaux, Université Bordeaux 1, F-33400 Talence, France

## Abstract

Anatomic and metabolic changes in central nervous system induced by 14 wk of vitamin A deprivation (VAD) were monitored and quantified in rats. In vivo brain magnetic resonance imaging (4.7T) was performed at 5, 7, 9, 11, and 14 wk of each diet after weaning in the following: 1) VAD group; 2) control pair-fed group; and 3) control group that consumed the diet ad libitum (1.15  $\mu\text{g}$  retinol/g diet). After 14 wk, high-resolution magic angle spinning proton NMR spectroscopy (11.7T) was performed on small samples of cortex, hippocampus, and striatum. Serum retinol concentrations remained stable and cerebral volume (CV) increased as a linear function of body weight in the ad libitum group ( $R^2 = 0.78$ ;  $P = 0.047$ ) and pair-fed controls ( $R^2 = 0.78$ ;  $P = 0.046$ ). In VAD rats, retinol decreased from the onset of deprivation ( $2.2 \pm 0.14 \mu\text{mol/L}$ ) to reach  $0.3 \pm 0.13 \mu\text{mol/L}$  at wk 5, followed by a stopping of body weight gain from wk 7. In VAD rats, the CV decreased from wk 5 and reached a value 11% lower than that of the control group ( $P < 0.001$ ) at wk 14 and was correlated with retinol status ( $R^2 = 0.99$ ;  $P = 0.002$ ). The VAD hippocampal volume decreased beginning at wk 9 and was 22% lower than that of the control group at wk 14 ( $P < 0.001$ ). Compared with the control, VAD led to lower *N* acetyl aspartate: creatine + phosphocreatine (Cr) in cortex ( $-36\%$ ), striatum ( $-22\%$ ), and hippocampus ( $-19\%$ ) and higher myoinositol:Cr in cortex ( $+127\%$ ) and striatum ( $+150\%$ ). VAD induced anatomic and metabolic changes comparable to those associated with neurodegenerative disorders. By wk 7 of deprivation, the slowing in cerebral growth that correlated with the retinol level could be considered as a predictive marker of brain disorders, confirmed by metabolic data from VAD rats after 14 wk. *J. Nutr.* 139: 696–702, 2009.

## Introduction

Nutritional disturbances such as vitamin A deficiency are considered more and more as environmental factors that influence the development of many diseases. Vitamin A plays a critical role in a variety of essential life process, including vision, growth, reproduction, and immunity (1). It is provided only from diet, either from meat in the form of retinyl esters or from vegetables as  $\beta$ -carotene.

Although vitamin A-rich food is generally available in the western world, risk groups for low vitamin A supply exist (2). This real or borderline vitamin deficiency can produce various disorders in infants and elderly people, in burn patients, and in subjects consuming unbalanced diets or undergoing strenuous physical exercise (3,4) in industrialized countries.

Mammals cannot synthesize vitamin A, so they must extract it from their diet in the form of carotenoids (from plants) and retinyl esters (from animal products). These dietary components are stored as retinyl esters (also known as retinoids) in the liver and in several extrahepatic sites, including the lungs, bone marrow, and the kidneys (5). Transport of retinoids from these storage sites to the target cells is performed under retinol form, which is released into the bloodstream and circulates bound to retinol-binding protein 4. Retinol is taken up by target cells, then enters the cytoplasm, and is metabolized into retinaldehyde and then into all-*trans* retinoic acid (RA).<sup>4</sup>

Besides retinaldehyde acting on vision, RA is the active form of vitamin A, which acts in the control of gene expression. Indeed, RA induces or represses gene transcription through binding to specific nuclear receptors, which are transcription

<sup>1</sup> Author disclosures: N. Ghenimi Rahab, M.-C. Beauvieux, M. Biran, V. Pallet, P. Higuieret and J.-L. Gallis, no conflicts of interest.

\* To whom correspondence should be addressed. E-mail: jean.louis.gallis@free.fr.

<sup>4</sup> Abbreviations used: AD, Alzheimer's disease; Cho, choline; CNS, central nervous system; Cr, creatine+phosphocreatine; CV, cerebral volume; HRMAS, high-resolution magic angle spinning; MIns, myoinositol; MRI, magnetic resonance imaging; NAA, *N* acetyl aspartate; RA, retinoic acid; RAR, retinoic acid receptor; TE, time echo; TR, time repetition; VAD, vitamin A deprivation.

factors, such as RA receptor (RAR) and retinoic X receptor (6). In the brain, they regulate transcription of a wide range of genes (>300) such as neuromodulin and neurogranin, which are associated with neuronal plasticity (7,8). Hence, retinoids are thought to be involved in adult neuronal system functioning. Retinoids also play a role in normal and pathological aging (9). Because brain levels of retinoid diminish over the course of normal aging, retinoid deficiency was observed to be greater in late-onset Alzheimer's disease (AD) brains than in normal-aged human controls, as demonstrated by hypoexpression of retinaldehyde dehydrogenase 2 and RAR $\alpha$  in neurons of the neocortex of individuals with AD (10,11).

The adult brain possesses all the machinery to metabolize and produce RA from retinol supplied by the blood. In the brain, the highest levels of RA were observed in the striatal region, which strongly expressed RAR $\beta$ , one of the RAR isoforms. The hippocampus is a region highly involved in neuronal processes such as synaptic plasticity, long-term depression, and long-term potentiation, which are all strongly affected by changes in vitamin A availability (12). Previous studies have shown the presence of retinoid-specific receptors in the hippocampus and have demonstrated that vitamin A deficiency produces a severe deficit in spatial learning and memory, which are linked to proper hippocampal hypofunctioning (13). In aged mice where RA signaling is hypoactivated in the brain, supplemental RA can help reverse the age-related decrease in hippocampal long-term potentiation (14). Moreover, in aged rats, the retinoid signaling pathway was also hypoactivated and was associated with memory disorders (15). All these processes are reversible with RA administration (14,16). Hypoexpression of retinoid signaling induced by vitamin A deprivation (VAD) in rats (15) is accompanied by severe impairment in spatial learning and memory tasks, with  $\beta$ -amyloid plaque deposition occurring in cortical blood vessels, a feature of AD (11). Recently, it has been shown that RA protects hippocampal neurons from apoptosis induced by the amyloid  $\beta$ -peptide (17). RA together with its receptors regulates the expression of numerous target genes involved in late-onset AD (10).

Imaging techniques are now able to visualize cellular processes in the brain in both physiological and pathophysiological settings. Magnetic resonance imaging (MRI) studies have shown in humans that neurodegeneration is associated with brain atrophy and that hippocampal atrophy occurs in AD (18,19). On the other hand, to our knowledge, few metabolic studies have been performed using high resolution magic angle spinning (HRMAS) proton NMR spectroscopy, which offers the simultaneous high resolution of both polar and apolar metabolites on small brain biopsies with highly resolved spectra (20,21).

In major biological processes, gene expression disturbances are associated with anatomic and metabolic changes. Moreover, to our knowledge, no anatomic and/or metabolic studies have focused on the effect of VAD or retinoid signaling pathway disturbances. The present work therefore used MRI and HRMAS spectroscopy to monitor and quantify anatomic and metabolic changes in the central nervous system (CNS) in rats during VAD. Proton HRMAS spectroscopy was used to study the metabolism of specific regions known to be affected in VAD, such as the striatum, hippocampus, and cortex.

## Materials and Methods

**Rat experiments.** Weaned male Wistar rats (initial weight 45–50 g) were purchased from Harlan. They were housed in individual hanging cages in a room with a constant airflow system, controlled temperature

(21–23°C), and a 12-h-light/dark system. They were divided into 3 experimental groups receiving diets for 14 wk after weaning: vitamin A-deficient group, pair-fed group, and control group ( $n = 5$ –10). Rats consumed the diets ad libitum, except for the pair-fed group, and they all had free access to water. The control diet was the same as the VAD diet (Harlan) (Table 1) plus vitamin A (1515 retinol equivalent/kg diet or 1.15  $\mu$ g retinol/g diet). Food intake was monitored. We weighed all rats every 2 d to monitor body weight. The study complied with the 1999 UFAW guidelines (22). The protocol for these experiments was approved by the Ethics Committee for Animal Experiments at our university.

**MRI and brain volume.** In vivo NMR brain imaging was performed in all groups at 5, 7, 9, 11, and 14 wk after the onset of the experiment with a 4.7 T Spectro-imager Bruker (Germany) equipped with a 12-cm gradient system (0.85 T/m). The same rats were monitored repeatedly over time. Rats were anesthetized by isoflurane 1.5% in a O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> mixture. The dose was monitored from outside the magnet and gas was delivered through an extension line. T2-weighted Turbo Spin Echo sequence (Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement) was used for transversal [time echo (TE) = 69 ms; time repetition (TR) = 5785 ms; 24 scans] and sagittal slices (TE = 69 ms; TR = 4805 ms; 24 scans) with a spatial resolution of 1.8  $\times$  1.8 cm and consecutive 1-mm slices. Three-dimensional images were obtained with a Flash 3D sequence (TE = 4 ms; TR = 10 ms; 8 scans). Total brain and hippocampal volumes were evaluated with AMIRA 6.0 software from MRI volumetry.

**HRMAS 1H NMR spectroscopy.** At the end of wk 14, rats from the 3 groups were anesthetized by 1 intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (50 mL/kg of body weight). A longitudinal incision was rapidly made on the scalp of the rats to reveal the cranium. Brains were then frozen in situ by the “funnel freezing” method as described by Pontén et al. (23) to avoid postmortem failure of energy metabolism. After instant decapitation with a scientific guillotine, the brain was then removed and kept at –80°C. HRMAS H1 NMR spectroscopy using a DPX 500 Bruker (50- $\mu$ L rotor) operating at 11.7 T was performed on samples (20–30 mg) of cortex, hippocampus, and striatum maintained at 273 K throughout the experiment. Each sample was placed in a 50- $\mu$ L insert (Bruker Biospin), 20  $\mu$ L of D<sub>2</sub>O was added, and the total relaxed spectrum with suppression of water resonance was analyzed (size, 32 K; no. of scans, 64; total acquisition time, 12 min 37 s; relaxation time, 8 s) (water signaling suppression). Because of their importance in cerebral metabolism, the content of metabolites, such as N acetyl aspartate (NAA; 2.01 ppm), choline (Cho; 3.20 ppm), taurine (Tau; 3.25 ppm), and myoinositol (MIns, 3.55 ppm), was analyzed with Bruker software

**TABLE 1** Formulation of the vitamin A-free rat diet<sup>1</sup>

Ingredient	Amount
	g/kg
Vitamin-free casein	193
Sucrose	510
Corn starch	150
Cottonseed oil	50
Cellulose	50
Mineral mix <sup>2</sup>	43.49
Vitamin mix and Cho <sup>3</sup>	5.05
Protein	177
Carbohydrate	649
Fat	50
Energy, kJ/g	15.9

<sup>1</sup> VAD diet from Harlan. Diets were stored in sealed bags at 4°C.

<sup>2</sup> Composition of mineral mix (g/kg): mineral mix AIN-76 (170915), 35; calcium carbonate CaCO<sub>3</sub>, 4; Cho dihydrogene citrate, 3.497.

<sup>3</sup> Composition of vitamin mix (g/kg): DL- $\alpha$ -tocopherol acetate, 0.121; dry cholecalciferol (500 kJ/g), 0.0044; ascorbic, 1.0166; biotin, 0.0004; vitamin B-12, 0.0297; calcium pantothenate, 0.0661; folic acid, 0.002; inositol, 0.1101; menadione, 0.0496; niacin, 0.0991; pyridoxine HCl, 0.022; riboflavin, 0.022; thiamin HCl, 0.022.



XWIN NMR to obtain ratios relative to total creatine (Cr; 3.01 ppm; including creatine+phosphocreatine).

**Serum retinol assay.** Every 2 wk, 400  $\mu\text{L}$  of blood from the caudal vein was withdrawn and serum retinol was measured by HPLC according to the method of Leclercq and Bourgeay-Causse (24).

**Statistical analysis.** All data were expressed as means  $\pm$  SEM. For regression analysis, significances were calculated from a Pearson correlation. The statistical significance of differences between means was calculated using Statgraphics Plus software (Manugistics). Data were submitted to ANOVA (with repeated measures in longitudinal studies). When appropriate, post hoc comparisons were performed using Tukey tests. Statistical significance was accepted at  $P < 0.05$ .

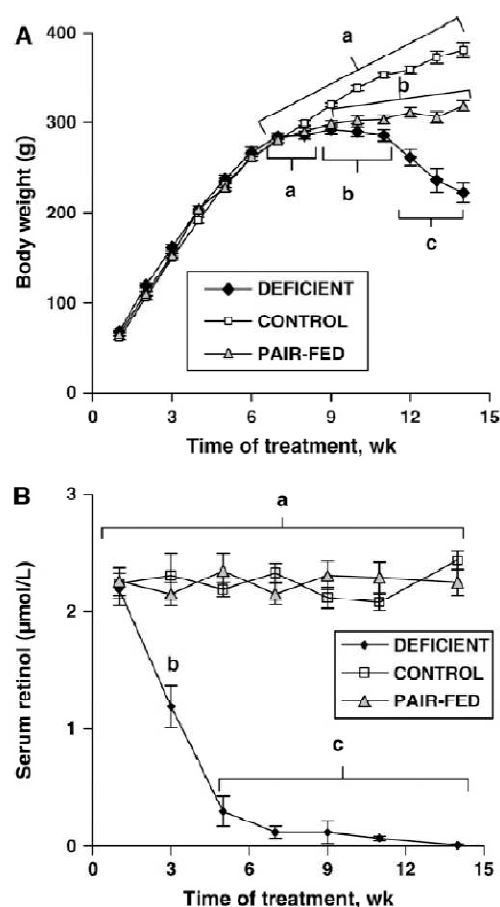
## Results

**Effect of vitamin A-free diet on body weight.** In this study, rats were deprived of vitamin A for 14 wk from weaning, because it had previously been demonstrated that 10 wk of diet was scarcely sufficient to produce any effect of VAD (25,26). Whereas the food intake was similar between the VAD and ad libitum controls until 7 wk as previously measured (27), it decreased with a longer deprivation, probably because of the deterioration of the rats' general health as previously reported (28,29). In contrast, the control-pair fed rats were in good overall health despite a decrease in the rate of weight gain between wk 7 and 8; beginning at wk 9, they weighed less than the ad libitum controls ( $P < 0.001$ ) and had no specific clinical signs of VAD. The VAD group stopped gaining weight between wk 7 and 8, they weighed less than the ad libitum controls at wk 9 ( $P = 0.0025$ ) and less than the pair-fed controls beginning at wk 12 ( $P = 0.002$ ). The body weight of the VAD group reached a plateau and then decreased beginning at wk 11. The weight at wk 14 was about 23% less than at the plateau. The mean difference in body weight after 14 wk was  $158 \pm 9.8\text{g}$  ( $\Delta = -41\%$ ) between the VAD and ad libitum control rats and  $71 \pm 4.0\text{g}$  ( $\Delta = -19\%$ ) between the control-pair fed and ad libitum control groups (Fig. 1A).

**Serum retinol assay.** Serum retinol concentration remained constant and similar throughout the experiment in the control group consuming the diet ad libitum and in control pair-fed rats (Fig. 1B). In the VAD rats, it decreased exponentially from the onset of deprivation ( $2.2 \pm 0.14 \mu\text{mol/L}$ ), becoming significant at wk 3 compared with the ad libitum controls ( $P = 0.008$ ) and the pair-fed group ( $P = 0.005$ ); retinol reached  $0.3 \pm 0.13 \mu\text{mol/L}$  at wk 5 ( $P < 0.001$  vs. controls) and  $< 0.01 \mu\text{mol/L}$  at wk 11.

At the end of the 14-wk experiment, retinol concentration was  $2.4 \pm 0.08 \mu\text{mol/L}$  in the control-pair fed and ad libitum control groups, whereas it was under the detection limit of  $0.01 \mu\text{mol/L}$  in the VAD group.

**MRI and global cerebral volume.** Cerebral volume (CV) (Fig. 2A), like body weight, progressively increased in the control ad libitum rats and to a lesser extent in the pair-fed rats from wk 5 to 14, leading to a linear relationship between CV and body weight ( $\text{CV} = 0.86 \text{ body weight} + 1863$ ;  $R^2 = 0.78$ ;  $P = 0.047$  for the ad libitum control rats; and  $0.63 \text{ body weight} + 1925$ ;  $R^2 = 0.78$ ;  $P = 0.046$  for pair-fed rats). CV decreased with deprivation time in the VAD rats; the decrease was significant at wk 14 compared with wk 5 ( $P = 0.025$ ) ( $\text{CV} = -3.66 \text{ wk} + 2050$ ;  $R^2 = 0.87$ ;  $P = 0.021$ ). The VAD rats differed from the ad libitum ( $P = 0.025$ ) and pair-fed control ( $P = 0.026$ ) groups from wk 7 to wk 14. At the end of the



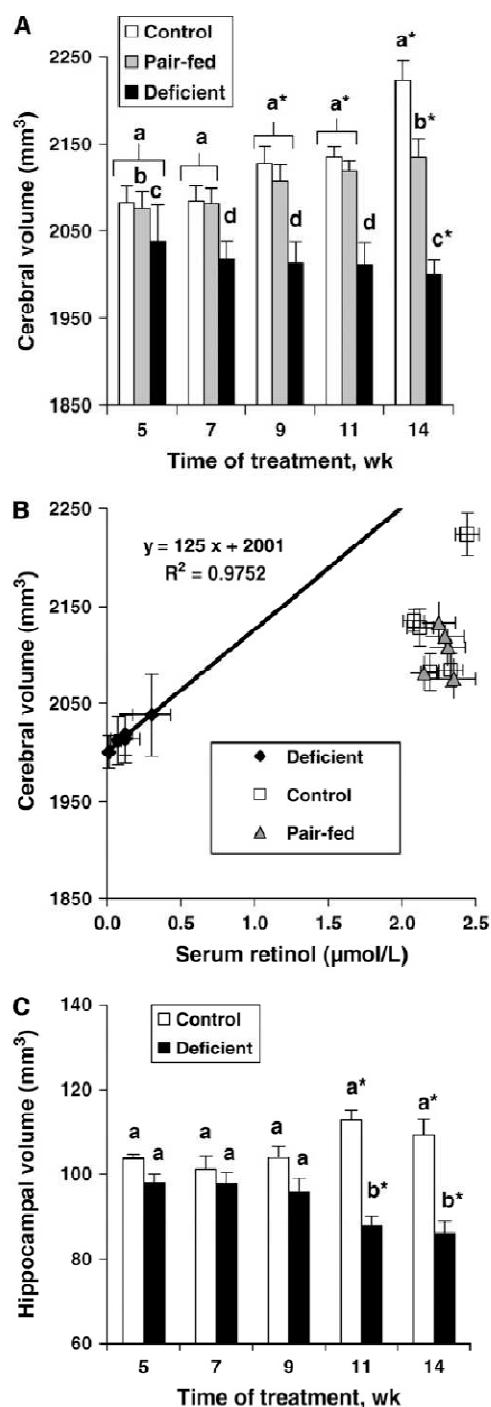
**FIGURE 1** Effect of vitamin A diet on body weight (A) and serum retinol (B) in VAD rats, pair-fed rats, and ad libitum control rats. Values are means  $\pm$  SEM,  $n = 5-10$ . Labeled means at a time without a common letter differ,  $P < 0.002$ .

protocol, the CV of the VAD rats ( $1995 \pm 15 \text{ mm}^3$ ) was  $-10.3\%$  lower than that of the control rats ( $2224 \pm 20 \text{ mm}^3$ ) ( $P < 0.001$ ). Moreover, in the VAD rats, there was a linear correlation ( $R^2 = 0.99$ ;  $P = 0.002$ ) between CV and serum retinol status (Fig. 2B), indicating a strong relationship between the decreased retinol and the decreased CV. Conversely, no such a relationship was observed in the control groups, because serum retinol was stable at  $\sim 2.2-2.4 \mu\text{mol/L}$ .

**Hippocampal CTThV.** The hippocampal volume decreased in VAD rats at wk 11 and wk 14 compared with wk 5 ( $P < 0.001$ ) in VAD and to the 2 control groups ( $P < 0.001$ ); it reached 22% lower than controls during the last week of experimentation (Fig. 2C).

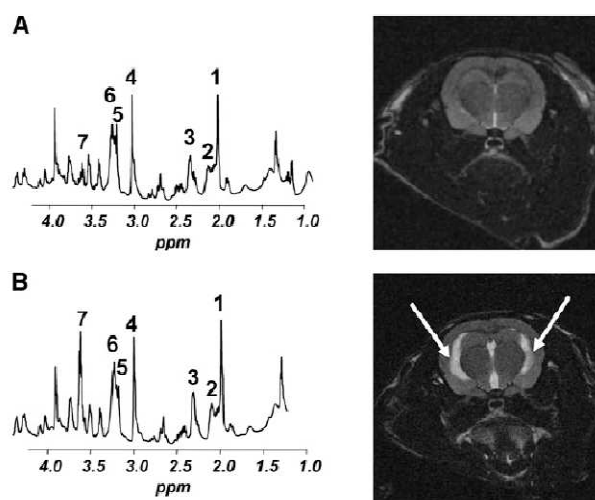
**Ventricular spaces.** Compared with those in all control rats (Fig. 3A), a strong increase in ventricular spaces was observed on coronal images in VAD rats (Fig. 3B) at wk 11. Globally, this increase began between wk 9 and 11 of VAD.

**Quantification of NMR-visible metabolites.** Typical  $^1\text{H}$  HRMAS NMR spectra from brain cortex in the ad libitum control rats and in the VAD rats are shown (Fig. 3A,B), respectively. Spectra obtained in the control pair-fed rats were similar to those of the ad libitum rats.



**FIGURE 2** Evolution of cerebral (A) and hippocampal (C) volume in VAD rats, pair-fed rats, and ad libitum control rats measured by MRI volumetry. Values are means  $\pm$  SEM,  $n = 5-10$ . Labeled means at a time without a common letter differ,  $P < 0.03$  \*Different from wk 5 in that group,  $P < 0.05$ . (B) Correlation between serum retinol and cerebral volume in VAD rats.

The NAA:Cr in cortex, striatum, and hippocampus biopsies was lower in the VAD rats than in control rats ( $P < 0.05$ ). In the cortex, the metabolite level was 36% lower than in controls, whereas the reduction in the striatum and hippocampus was 22.3% and 19.2%, respectively (Fig. 4A).



**FIGURE 3** Typical pictures obtained by in vivo MRI of transversal slices of brain and typical  $^1\text{H}$  HRMAS NMR spectra from brain cortex in the ad libitum control (A) and VAD (B) rats. Pictures were obtained at wk 11 of VAD. Each picture corresponded to the same slice. Ventricular spaces increased in VAD rat brain (arrows). Field of view: 1.8 cm  $\times$  1.8 cm. NMR spectra peak assignments: 1, NAA; 2, glutamate+glutamine (Glx); 3,  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA); 4, Cr; 5, Cho; 6, Tau; 7, MIns.

The MIns:Cr was 127% and 150% higher in the cortex and striatum of the VAD rats compared with the controls ( $P < 0.01$ ) (Fig. 4B).

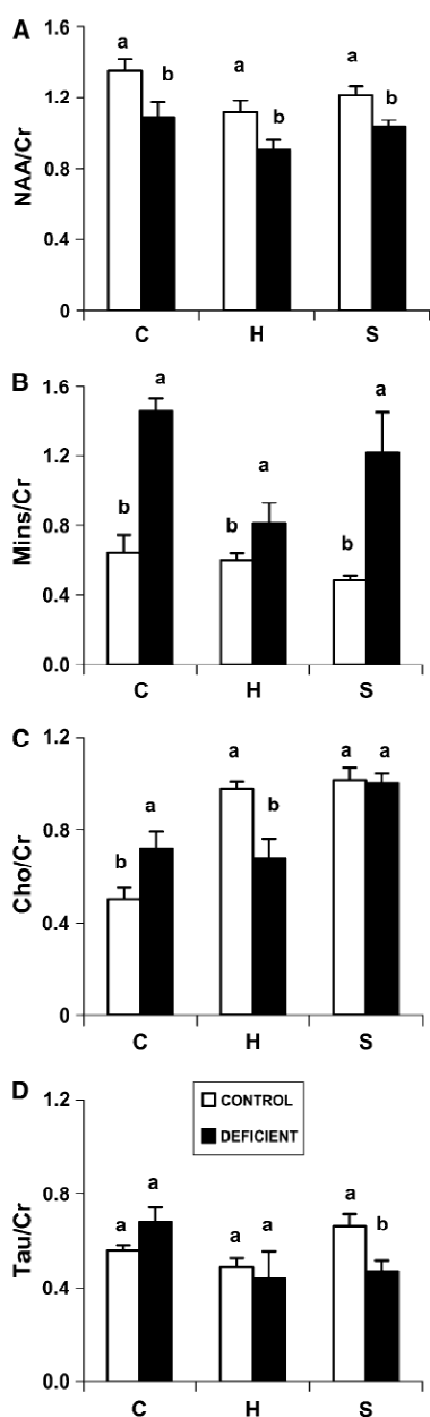
The Cho:Cr was higher in the cortex of the VAD rats (+42%) than in the control rats ( $P < 0.05$ ), whereas in the hippocampus, it was 31% lower than in controls ( $P < 0.05$ ) (Fig. 4C).

In the striatal region, Tau:Cr was lower in the VAD rats (-29%) than in the controls ( $P < 0.05$ ). In the cortex, this ratio tended to be higher (+18%;  $P = 0.11$ ) than in the control rats (Fig. 4D).

## Discussion

The major functional involvement of retinoic signaling has been repeatedly suggested in synaptic plasticity, learning and memory, sleep, schizophrenia, depression, Parkinson disease, and AD (30). Studies have shown that nutritional VAD in rats induces several disorders such as decrease in food intake, loss in growing body weight, motivity disturbances, behavioral effect, and neuronal disturbances (31) and might lead to neurodegenerative damage.

One of the main strengths of this study was that it analyzed at the same time the effects of VAD on both anatomic and metabolic changes. Moreover, this is the first study, to our knowledge, of the cerebral metabolism in VAD rats, with a follow-up of anatomic and metabolic changes in relation to serum retinol levels. The protocol distinguishes the primary effects of VAD from secondary effects due to reduced food intake. A slight slowing in body weight gain is not a specific effect of VAD, because it was observed in the control pair-fed group because of the reduction in available food and it was not accompanied by a decreased retinol level, as previously shown (29). As confirmed in the present work, nutritional VAD efficiently induces a large depletion in serum retinol concentration within 5 wk (28,29). This serum retinol depletion precedes the arrest in body weight gain at wk 7, which in turn is followed by a body weight decrease at wk 11.



**FIGURE 4** Relative content of NMR visible brain metabolites in VAD and ad libitum control rats at wk 14 expressed as ratio to Cr: (A) NAA, (B) MIns, (C) Cho, (D) Tau in cortex (C), hippocampus (H), and striatum (S). Values are means  $\pm$  SEM,  $n = 5-10$ . For each brain structure, means without a common letter differ,  $P < 0.05$ .

More specific is the evidence of the early decrease in global CV after 5 wk of VAD, which is strongly correlated to retinol level, and of the slightly delayed decrease in hippocampal volume. These progressive brain disorders were confirmed by metabolic brain distortions in 14-wk-old VAD rats. AD patients

lose 8–10% of their brain volume weight every 10 y compared with  $\sim 2\%$  in the normal aging brain. This atrophy affects the cortical and hippocampal structures and is accompanied by a cerebral ventricular dilatation. It has been demonstrated that the rate of evolution of hippocampal atrophy is predictive of AD progression (32,33). The association of a loss of cerebral growth volume compensated by an increase in ventricular spaces could be used as an early marker of cerebral disorders in the VAD model. By using metabolites as specific markers of neuronal and glial functionality, we attempted to establish relationships between anatomic and metabolic disturbances. HRMAS proton NMR spectroscopy has several advantages. First, spectroscopy was directly performed on very small tissue biopsies (20 mg) without any metabolite extraction that might damage tissue structures. Second, the neurochemical profile of distinct small brain structures (cortex, hippocampus, and striatum) can be obtained in a few minutes. Moreover, this makes it possible to observe concomitantly both polar and apolar metabolites. However, one of the limitations could be the choice of the reference to quantify the metabolite changes. Metabolites are classically expressed as a ratio to Cr (34,35), the  $^1\text{H}$  NMR peak obtained at 3.01 ppm corresponding to both creatine and phosphocreatine. Creatine, phosphocreatine, and the enzyme creatine kinase are highly dependent on the energy metabolism. Creatine kinase has been reported to be unchanged (36) or inactivated in AD brain (37) depending on the method used. On the other hand, high total creatine concentrations measured by in vivo magnetic resonance spectroscopy in 3 parietal regions characterized the early stages of AD in humans (38). Nevertheless, the present work was conducted by studying relative changes for each region and allows accurate conclusions. Further experiments on brain biopsies could use a very recent automatic quantitation of HRMAS signals achieved by the semiparametric algorithm QUEST (39).

Several significant differences in brain metabolites between the control and VAD rats are highly suggestive of neurodegenerative disorders induced by plasma retinol depletion. In this respect, the lower NAA than in the controls in the 3 brain structures was very instructive. NAA is a free amino acid present in the brain at relatively high concentrations, mainly in neurons (40). It is considered as a marker for neuronal health and attenuation. Indeed, with the exception of Canavan disease, its content has been reported to decline in CNS disorders associated with neurodegenerative processes (41). Lower NAA:Cr in the VAD rats than in the control rats may suggest neuronal loss and/or an altered ratio of neuronal volume to other cells such as microglia and/or astrocytes, cells known to be increased in the presence of  $\text{A}\beta$  plaques and related neuroinflammation (42). This low NAA content may be linked to the cerebral and hippocampal atrophy observed by MRI.

Many studies have described Tau as an amino acid playing a number of biological roles, including osmoregulation and modulation of the action of neurotransmitters. Its modifications have been associated with osmotic stress and astrogliosis (41). Here, a lower Tau:Cr in VAD than in controls in the striatum, a structure located near the ventricular spaces, could be due to possible osmotic disorders and exchanges in the intra- or extracellular water close by. In the cortex, a higher Tau:Cr in the VAD rats than in control rats is in agreement with data obtained in transgenic AD mice (43). On the other hand, the 2nd major CNS cellular population is the glial cells. MIns is a major marker of glial cells. Another argument for neurodegenerative disorders in VAD rats is demonstrated by the high level of MIns/Cr, which has also been found to be elevated in dementias

characterized by the presence of gliosis such as AD and fronto-temporal lobar degeneration (44). Here, this ratio was dramatically higher in the cortex and striatum of the VAD rats than in the controls. It has been suggested that increased brain MIns concentrations may be related to cognitive impairment, whereas unchanged levels have been associated with healthy aging (45).

Cho is an essential nutrient that is mainly obtained in the form of dietary phospholipids. It is required for synthesis of the neurotransmitter acetylcholine and for phosphatidylcholine, a major constituent of membranes. Changes in NMR resonances are generally associated with alterations of membrane composition; a signal increase is associated with head trauma and AD and a decreased signal is associated with liver disease and stroke (46). The biochemical interpretation of Cho resonance changes is therefore difficult, because this peak includes all Cho compounds (phosphatidylcholine, acetylcholine). A recent publication has shown a correlation between Cho NMR peaks and acetylcholine levels in rat brain structures (47). Here, the cortical content, which was 42% higher in the VAD rats than in the control rats, could be associated with membrane disturbances. On the other hand, in the hippocampus, the structure most heavily involved in VAD, Stancampiano et al. (48) have already shown a decrease in acetylcholine content after 12 wk of VAD, which can be correlated here by a decrease of ~31% in the Cho:Cr ratio. Acetylcholine is known to be an important excitatory neurotransmitter that plays a crucial role in synaptic transmission. Its level is decreased in early-stage AD.

All these arguments suggest that nutritional VAD in rats induces anatomic and metabolic changes comparable to those observed in brains exhibiting neurodegenerative disorders. Hippocampal atrophy combined with a loss of CV growth, a decreased NAA:Cr ratio and an increased MIns:Cr ratio in the cortex are considered as good markers of late-onset AD (49). In the present work, one of the major results is the evidence of both a synchronization and a correlation ( $R^2 = 0.99$ ;  $P = 0.002$ ) between serum retinol status and decreased CV. The slowing in cerebral growth observed from wk 5 could be considered as a predictive marker of brain disorders, which could be confirmed subsequently at 14 wk by metabolic analysis. Much of the research conducted on retinoid signaling in the CNS has focused on developmental effects in the embryonic or early postnatal brain (9). Moreover, it has already been shown that hypoactivation of retinoid signaling illustrated by a hypoexpression of RAR $\beta$ , regulated by its own ligand, precedes memory tasks observed in the VAD model (25). Recent studies have opened up a new field of investigation with the hypothesis that retinoid deregulation occurring with aging or deficit in adults might play a role in the etiology of neurodegenerative diseases and especially in late-onset AD (10). Our results strengthen the idea that vitamin A status is important for normal functioning of adult brain metabolism.

Administration of RA for 7 d during wk 14 of VAD improved general rat health by a reduction of body weight slowing compared with VAD rats (N. Ghenimi Rahab, M. C. Beauvieux, P. Higuere, J. L. Gallis, unpublished data). It would now be interesting to study whether RA treatment reverses metabolic disorders, which generally occur earlier than or concomitant with anatomic ones. This idea is in agreement with recent studies that suggest that long-term  $\beta$ -carotene supplementation in humans is beneficial for verbal memory and cognitive performances (50). Hence, the retinoid signaling pathways could be a potential novel preventive target for neurological diseases (9,17), either in the form of vitamin A supplementation in addition to other recognized vitamin supplementation such as

vitamin E (51), or with an activator of the retinoid signaling pathway, such as RA as recently demonstrated (52).

#### Acknowledgment

We thank Ray Cooke for language editing.

#### Literature Cited

- Bonet ML, Ribot J, Felipe FA. Vitamin A and the regulation of fat reserves. *Cell Mol Life Sci.* 2003;60:1311–21.
- Strobel M, Tinz J, Biesalski HK. The importance of beta-carotene as a source of vitamin A with special regard to pregnant and breastfeeding women. *Eur J Nutr.* 2007;46:1–20.
- Brubacher G, Hornig D, Ritzel G. Food patterns in modern society and their consequences on nutrition. *Bibl Nutr Dieta.* 1981;30:90–9.
- Filiberti R, Giacosa A, Brignoli O. High-risk subjects for vitamin deficiency. *Eur J Cancer Prev.* 1997;6:537–42.
- Ross AC. Retinoid production and catabolism: role of diet in regulating retinol esterification and retinoic acid oxidation. *J Nutr.* 2003;133:S291–6.
- Marill J, Idres N, Capron CC, Nguyen E, Chabot GG. Retinoic acid metabolism and mechanism of action: a review. *Curr Drug Metab.* 2003;4:1–10.
- Pak JH, Huang FL, Li J, Balschun D, Reymann KG, Chiang C, Westphal H, Huang KP. Involvement of neurogranin in the modulation of calcium/calmodulin-dependant protein kinase II, synaptic plasticity and spatial learning: a study with knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97:11232–7.
- Routtenberg A, Cantallos I, Zaffuto S, Serrano P, Namgung U. Enhanced learning after genetic overexpression of a brain growth protein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97:7657–62.
- Lane MA, Bailey SJ. Role of retinoid signalling in the adult brain. *Prog Neurobiol.* 2005;75:275–93.
- Goodman AB. Retinoid receptors, transporters, and metabolizers as therapeutic targets in late onset Alzheimer disease. *J Cell Physiol.* 2006;209:598–603.
- Corcoran JP, So PL, Maden M. Disruption of the retinoid signalling pathway causes a deposition of amyloid  $\beta$  in the adult rat brain. *Eur J Neurosci.* 2004;20:896–902.
- Bremner JD, McCaffery P. The neurobiology of retinoic acid in affective disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2008;32:315–31.
- Hernández-Pinto AM, Puebla-Jiménez L, Arilla-Ferreiro E. A vitamin A-free diet results in impairment of the rat hippocampal somatostatinergic system. *Neuroscience.* 2006;141:851–61.
- Etchamendy N, Enderlin V, Marighetto A, Vouimba RM, Pallet V, Jaffard R, Higuere P. Alleviation of a selective age-related relational memory deficit in mice by pharmacologically induced normalization of brain retinoid signaling. *J Neurosci.* 2001;21:6423–9.
- Etchamendy N, Enderlin V, Marighetto A, Pallet V, Higuere P, Jaffard R. Vitamin A deficiency and relational memory deficit in adult mice: relationships with changes in brain retinoid signalling. *Behav Brain Res.* 2003;145:37–49.
- Enderlin V, Pallet V, Alfos S, Dargelos E, Jaffard R, Garcin H, Higuere P. Age-related decreases in mRNA for brain nuclear receptors and target genes are reversed by retinoic acid treatment. *Neurosci Lett.* 1997;229:125–9.
- Sahin M, Karazum SB, Perry G, Smith MA, Aliciguzel Y. Retinoic acid isomers protect hippocampal neurons from amyloid-beta induced neurodegeneration. *Neurotox Res.* 2005;7:243–50.
- Hsu YY, Du AT, Schuff N, Weiner MW. Magnetic resonance imaging and magnetic resonance spectroscopy in dementias. *J Geriatr Psychiatry Neurol.* 2001;14:145–66.
- Jagust WJ, Zheng L, Harvey DJ, Mack WJ, Vinters HV, Ellis WC, Zarow C, Mungas D, Reed BR, et al. Neuropathological basis of magnetic resonance images in aging and dementia. *Ann Neurol.* 2008;63:72–80.
- Opstad KS, Bell BA, Griffiths JR, Howe EA. An investigation of human brain tumour lipids by high-resolution magic angle spinning 1H MRS and histological analysis. *NMR Biomed.* 2008;21:677–85.
- Ratai EM, Pilkenton S, Lentz MR, Greco JB, Fuller RA, KimJP, He J, Cheng LL, Gonzalez RG. Comparisons of brain metabolites observed

- by HRMAS 1H NMR of intact tissue and solution 1H NMR of tissue extracts in SIV-infected macaques. *NMR Biomed.* 2005;18:242–51.
22. VandeBerg JL. Handbook on the care and management of laboratory animals. 1st vol. 7th ed. In: Poole T, English P editors. *Terrestrial vertebrates*. Oxford: 1999.
  23. Pontén U, Ratcheson RA, Salford LG, Siesjö BK. Optimal freezing conditions for cerebral metabolites in rats. *J Neurochem.* 1973;21:1127–38.
  24. Leclercq M, Bourgeay-Causse M. Une méthode simple fiable et rapide: dosage simultané du rétinol et du tocophérol sérique par chromatographie haute performance. *Rev. Inst. Pasteur Lyon.* 1981;14:475–96.
  25. Husson M, Enderlin V, Boucheron C, Alfos S, Pallet V, Higuieret P. Expression of neurogranin and neuromodulin is affected in the striatum of vitamin-A deprived rats. *Brain Res Mol Brain Res.* 2004;123:7–17.
  26. Husson M, Enderlin V, Delacourte A, Ghenimi N, Alfos S, Pallet V, Higuieret P. Retinoic acid normalizes nuclear receptor mediated hypoxpression of proteins involved in beta-amyloid deposits in the cerebral cortex of vitamin A deprived rats. *Neurobiol Dis.* 2006;23:1–10.
  27. Audouin-Chevallier I, Higuieret P, Pallet V, Higuieret D, Garcin H. Dietary vitamin A modulates the properties of retinoic acid and glucocorticoid receptors in rat brain. *J Nutr.* 1993;123:1195–202.
  28. Muto Y, Smith JE, Milch PO, Goodman DS. Regulation of retinol-binding protein metabolism by vitamin A status in the rat. *J Biol Chem.* 1972;247:2542–50.
  29. Mejia LA, Hodges RE, Rucker RB. Clinical signs of anemia in vitamin A-deficient rats. *Am J Clin Nutr.* 1979;32:1439–44.
  30. Tafri M, Ghyselinck NB. Functional implication of the vitamin A signaling pathway in the brain. *Arch Neurol.* 2007;64:1706–11.
  31. Carta M, Stancampiano R, Tronci E, Collu M, Usiello A, Morelli M, Fadda F. Vitamin A deficiency induces motor impairments and striatal cholinergic dysfunction in rats. *Neuroscience.* 2006;139:1163–72.
  32. Khachaturian ZS. Diagnosis of Alzheimer's disease. *Arch Neurol.* 1985;42:1097–105.
  33. Hyman BT, Gomez-Isla T. The natural history of Alzheimer neurofibrillary tangles and amyloid deposits. *Neurobiol Aging.* 1997;18:386–7.
  34. Kantarci K, Knopman DS, Dickson DW, Parisi JE, Whitwell JL, Weigand SD, Josephs KA, Boeve BF, Petersen RC, et al. Alzheimer disease: postmortem neuropathologic correlates of antemortem 1H MR spectroscopy metabolite measurements. *Radiology.* 2008;248:210–20.
  35. Griffith HR, den Hollander JA, Stewart CC, Evanochko WT, Buchthal SD, Harrell LE, Zamrini EY, Brockington JC, Marson DC. Elevated brain scyllo-inositol concentrations in patients with Alzheimer's disease. *NMR Biomed.* 2007;20:709–16.
  36. Court J, Ferrier N, Griffiths H, Lauffart B, Perry R, Candy J, Fairbairn A, Blessed G. Serum creatine kinase-BB levels and cerebral cortical creatine kinase activity in senile dementia of the Alzheimer type. *J Neurol Sci.* 1987;80:111–5.
  37. Bürklen TS, Schlattner U, Homayouni R, Gough K, Rak M, Szeghalmi A, Wallimann T. The creatine kinase/creatine connection to Alzheimer's Disease: CK-inactivation, APP-CK complexes and focal creatine deposits. *J Biomed Biotechnol.* 2006;2006:35936.
  38. Huang W, Alexander GE, Chang L, Shetty HU, Krasuski JS, Rapoport SI, Schapiro MB. Brain metabolite concentration and dementia severity in Alzheimer's disease: a (1)H MRS study. *Neurology.* 2001;57:626–32.
  39. Rabeson H, Fauvelle F, Testylier G, Foquin A, Carpentier P, Dorandeu F, van Ormondt D, Graveron-Demilly D. Quantitation with QUEST of brain HRMAS-NMR signals: application to metabolic disorders in experimental epileptic seizures. *Magn Reson Med.* 2008;59:1266–73.
  40. Uylings HB, de Brabander JM. Neuronal changes in normal human aging and Alzheimer's disease. *Brain Cogn.* 2002;49:268–76.
  41. Moffett JR, Namboodiri MA, Cangro CB, Neale JH. Immunohistochemical localization of N-acetylaspartate in rat brain. *Neuroreport.* 1991;2:131–4.
  42. Rigotti DJ, Inglese M, Gonen O. Whole-brain N-acetylaspartate as a surrogate marker of neuronal damage in diffuse neurologic disorders. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2007;28:1843–9.
  43. Dedeoglu A, Choi JK, Cormier K, Kowall NW, Jenkins BG. Magnetic resonance spectroscopic analysis of Alzheimer's disease mouse brain that express mutant human APP shows altered neurochemical profile. *Brain Res.* 2004;1012:60–5.
  44. Martin WR. MR spectroscopy in neurodegenerative disease. *Mol Imaging Biol.* 2007;9:196–203.
  45. Haga KK, Khor YP, Farrall A, Wardlaw JM. A systematic review of brain metabolite changes measured with 1H magnetic resonance spectroscopy in healthy aging. *Neurobiol Aging* 2007 Aug 22. Epub ahead of print.
  46. Govindaraju V, Young K, Maudsley AA. Proton NMR chemical shifts and coupling constants for brain metabolites. *NMR Biomed.* 2000;13:129–53.
  47. Wang XC, Du XX, Tian Q, Wang JZ. Correlation between choline signal intensity and acetylcholine level in different brain regions of rat. *Neurochem Res.* 2008;33:814–9.
  48. Stancampiano R, Carta M, Fadda F. Vitamin A deficiency affects neither frontocortical acetylcholine nor working memory. *Neuroreport.* 2007;18:241–3.
  49. Kantarci K, Xu Y, Shiung MM, O'Brien PC, Cha RH, Smith GE, Ivnik RG, Boeve BF, Edland SD, et al. Comparative diagnostic utility of different MR modalities in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2002;14:198–207.
  50. Grodstein F, Kang JH, Glynn RJ, Cook NR, Gaziano JM. A randomized trial of beta carotene supplementation and cognitive function in men: the Physicians' Health Study II. *Arch Intern Med.* 2007;167:2184–90.
  51. Ricciarelli R, Argellati F, Pronzato MA, Domenicotti C. Vitamin E and neurodegenerative diseases. *Mol Aspects Med.* 2007;28:591–606.
  52. Ding Y, Qiao A, Wang Z, Goodwin JS, Lee ES, Block ML, Allsbrook M, McDonald MP, Fan GH. Retinoic acid attenuates beta-amyloid deposition and rescues memory deficits in an Alzheimer's disease transgenic mouse model. *J Neurosci.* 2008;28:11622–34.

### 3- Effets d'une administration d'AR sur le métabolisme cérébral chez le rat carencé en vitamine A : étude par HRMAS du 1H

#### 3.1 Contexte et objectifs du travail

Nous avons montré dans l'étude longitudinale précédente par IRM que la carence vitaminique A chez le rat entraînait des altérations anatomiques cérébrales majeures dès la 7<sup>ème</sup> semaine de carence. Ces changements sont fortement corrélés au statut en rétinol sérique. Par ailleurs, des changements métaboliques connus pour être associés aux troubles de type neurodégénératifs ont également été observés après 14 semaines de carence dans le cortex, l'hippocampe et le striatum chez le rat (*Ghenimi Rahab N 2009*). A ce stade, l'expression des gènes codant pour des protéines de la plasticité synaptique est également fortement altérée (*Husson et al. 2004*).

On sait par ailleurs que certains processus biologiques peuvent être reversés à un stade modéré de carence vitaminique A par une administration d'AR acide rétinoïque (AR) (*Etchamendy et al. 2003; Husson et al. 2006; Bonnet et al. 2008*). Ainsi l'administration d'AR chez l'animal âgé ou chez des souris transgéniques pour la MA (i) rétablit les déficits de mémoire et d'apprentissage spatial (*Etchamendy et al. 2001; Etchamendy et al. 2003; Ding et al. 2008*) et (ii) réduit l'accumulation de peptides A $\beta$  ainsi que l'hyperphosphorylation de la protéine Tau (*Ding et al. 2008*). Ces données suggèrent qu'une activation de la voie de signalisation des rétinoïdes serait une stratégie potentielle d'amélioration du fonctionnement cérébral.

Dans ce contexte, l'**objectif de cette partie de notre travail** est double :

- déterminer l'existence potentielle des marqueurs métaboliques utiles à l'établissement d'un diagnostic précoce des effets pathologiques de la carence en vitamine A.
- préciser si ces modifications sont spécifiques de la réduction de la biodisponibilité en acide rétinoïque.

Pour répondre à ces deux volets, nous avons étudié l'effet de l'administration d'AR sur le profil neurométabolique chez des rats soumis à une carence limitée à 10 semaines.

#### 3.2 Méthodologie

Des rats Wistar (Harlan) ont reçu dès le sevrage un régime carencé en vitamine A (0 UI rétinol/g ; Laboratoire Piccionni, Italie) ou un régime témoin (5 UI rétinol/g ; INRA, Jouy en Josas, France) pendant 10 semaines seulement. Quatre groupes expérimentaux ont été constitués :

- Groupe témoin traité par le solvant (n=5) : groupe T
- Groupe témoin traité par l'AR (n=5) : groupe T+AR
- Groupe carencé traité par le solvant (n=5) : groupe C
- Groupe carencé traité par l'AR (n=5) : groupe C+AR

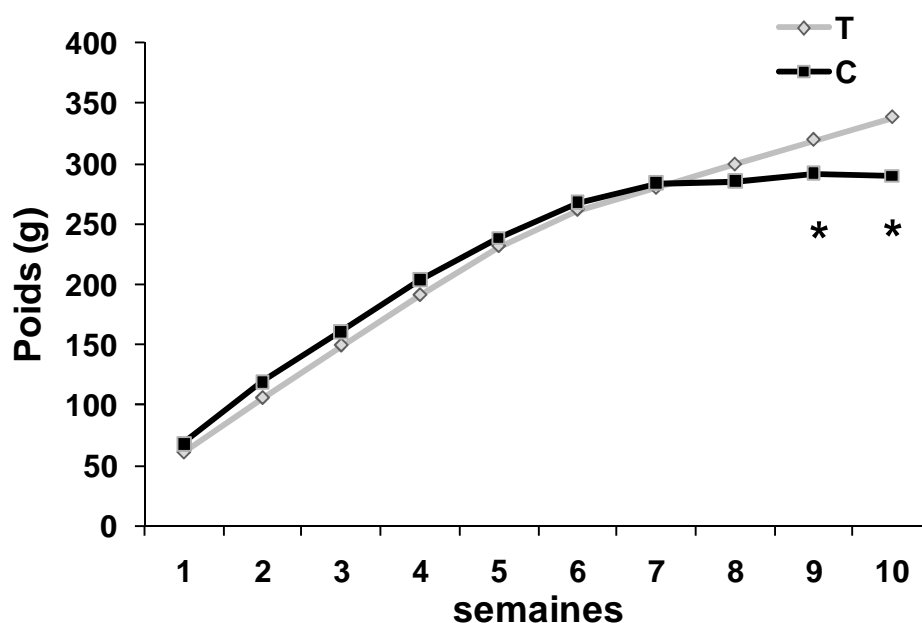
Le poids des animaux a été suivi tout au long de l'étude. L'AR (AR tout-*trans*, Sigma, France) a été administré pendant 4 jours consécutifs avant le sacrifice, par voie sous-cutanée, à une

dose de 150 $\mu$ g/kg de poids corporel, le solvant étant constitué d'un mélange de Polyéthylèneglycol-NaCl-Ethanol (70:20:10). Il a été préalablement montré que cette dose d'AR pendant cette durée est efficace pour réverser l'hypoexpression de certains gènes cibles des rétinoïdes observée au cours de la carence en vitamine A (Etchamendy et al. 2003; Husson et al. 2004) ou du vieillissement (Etchamendy et al. 2001). A la semaine 10, les cerveaux ont été congelés *in situ* par *funnel freezing* (Ponten et al. 1973); et après dissection, des échantillons de cortex (CX), d'hippocampe (H) et de striatum (S) ont été prélevés. L'étude des variations du profil neuro-métabolique a été réalisée par 1H HRMAS à 11,7 Tesla et les métabolites étudiés sont les mêmes que ceux préalablement décrits (Ghenimi et al. 2009). L'analyse des spectres métaboliques a permis le suivi du N Acétyl aspartate (NAA), de la choline (Cho), de la taurine (Tau), du Myoinositol (MIns), du couple Glutamate-Glutamine (Glx) et du Glutathion oxydé-réduit (GSH). La quantification relative de chaque métabolite est effectuée par rapport au couple créatine+phosphocréatine (Cr) considéré comme invariant.

### 3.3 Résultats

#### 3.3.1 Effet de la carence vitaminique A sur le poids corporel

Dans cette étude, la durée de 10 semaines de carence en vitamine A à partir du sevrage est suffisante pour induire un fort infléchissement du taux sérique de rétinol et induire les premiers signes physiopathologiques (Husson et al. 2003). Un arrêt de la croissance a été observé chez les rats dès la 7<sup>ème</sup> semaine de carence, devenant significatif à la 9<sup>ème</sup> semaine de carence ( $P=0.0025$ ) *versus* rats témoins (Figure 1). Aucun effet de l'administration d'AR n'a été observé sur le poids corporel chez le groupe carencé ou chez le groupe témoin (Figure 1).



**Figure 1 :** Effet de la carence en vitamine A sur le poids des rats carencés (C) et témoins (T). Pour chaque point, n=10, moyenne $\pm$ ESM, \* $p<0,05$  (t test).

### 3.3.2 Effet de 10 semaines de carence vitaminique A sur le profil neurométabolique

Les changements métaboliques induits par la carence en vitamine A après 10 semaines de régime sont limités au cortex, et impliquent essentiellement le NAA, marqueur neuronal, et le GSH, marqueur du statut antioxydant (**Tableau 1**). Une augmentation significative des deux métabolites NAA/Cr (+14%, P=0,049) (**Figure 2**) et GSH/Cr (+29%, P=0,049) (**Figure 3**) est trouvée dans le cortex; une tendance à l'augmentation est retrouvée dans le striatum pour le seul GSH (+19%, P= 0,09).

**Tableau 1 :** Effet d'une administration d'AR sur la quantité relative des métabolites chez le rat après 10 semaines post-sevrage chez les rats témoins (T) et carencés (C) : N acétyl aspartate (NAA), Glutathion oxydé-réduit (GSH), choline (Cho), taurine (Tau) et Glutamate-Glutamine (Glx) dans le cortex (CX), l'hippocampe (H) et le striatum (S). (expression par rapport au couple créatine+phosphocréatine (Cr)) Moyennes±ESM (n=5 pour chaque groupe). Pour chaque structure cérébrale, les groupes significativement différents pour le métabolite considéré sont marqués par une \* (entre carencés et témoins) et par un # pour l'effet de l'AR (P≤0,05).

Métabolites	C	C+AR	T	T+AR
<b>NAA/Cr</b>				
<b>CX</b>	1,16 ± 0,059*	1,01 ± 0,019#	1,01 ± 0,051	1,01 ± 0,061
<b>H</b>	0,92 ± 0,035	1,06 ± 0,072#	0,93 ± 0,042	1,00 ± 0,055
<b>S</b>	0,85 ± 0,078	0,98 ± 0,08	0,88 ± 0,080	1,02 ± 0,073
<b>GSH/Cr</b>				
<b>CX</b>	0,39 ± 0,038*	0,38 ± 0,027	0,30 ± 0,028	0,29 ± 0,023
<b>H</b>	0,36 ± 0,037	0,30 ± 0,017	0,32 ± 0,046	0,33 ± 0,026
<b>S</b>	0,38 ± 0,026	0,38 ± 0,050	0,32 ± 0,032	0,38 ± 0,033
<b>Cho/Cr</b>				
<b>CX</b>	1,03 ± 0,194	0,93 ± 0,132	0,68 ± 0,114	0,98 ± 0,118
<b>H</b>	1,08 ± 0,148	0,93 ± 0,083	0,79 ± 0,125	0,95 ± 0,125
<b>S</b>	0,87 ± 0,139	0,86 ± 0,128	0,83 ± 0,090	1,08 ± 0,125
<b>Tau/Cr</b>				
<b>CX</b>	0,36 ± 0,029	0,30 ± 0,024	0,37 ± 0,071	0,34 ± 0,027
<b>H</b>	0,29 ± 0,030	0,23 ± 0,018	0,28 ± 0,021	0,27 ± 0,039
<b>S</b>	0,41 ± 0,020	0,32 ± 0,047	0,36 ± 0,031	0,41 ± 0,055



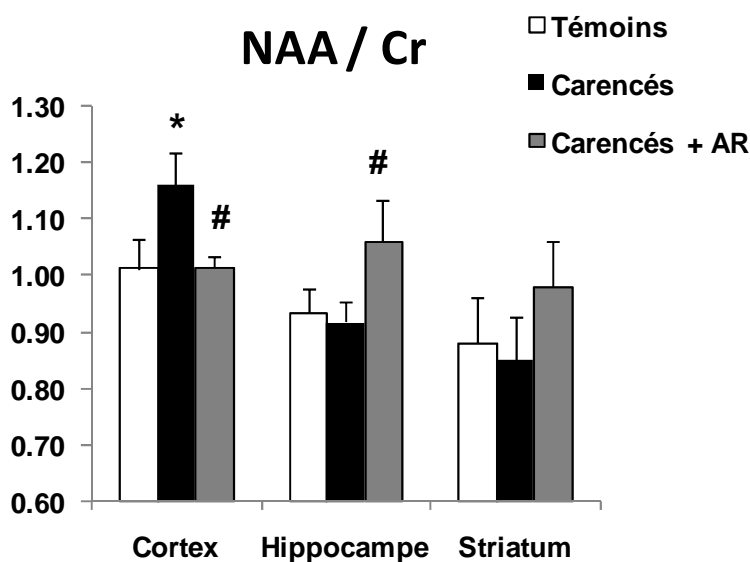
Glx/Cr				
CX	0,44 ± 0,061*	0,35 ± 0,033	0,33 ± 0,108	0,40 ± 0,070
H	0,34 ± 0,059	0,33 ± 0,046	0,37 ± 0,033	0,43 ± 0,053
S	0,39 ± 0,053	0,39 ± 0,064	0,36 ± 0,039	0,44 ± 0,025
Mins/Cr				
C	0,31 ± 0,027	0,37 ± 0,014#	0,32 ± 0,021	0,42 ± 0,036#
H	0,39 ± 0,032	0,40 ± 0,022	0,40 ± 0,023	0,45 ± 0,033
S	0,37 ± 0,010	0,39 ± 0,022	0,37 ± 0,045	0,43 ± 0,011

### 3.3.3 Effet d'une administration d'AR sur le profil neurométabolique.

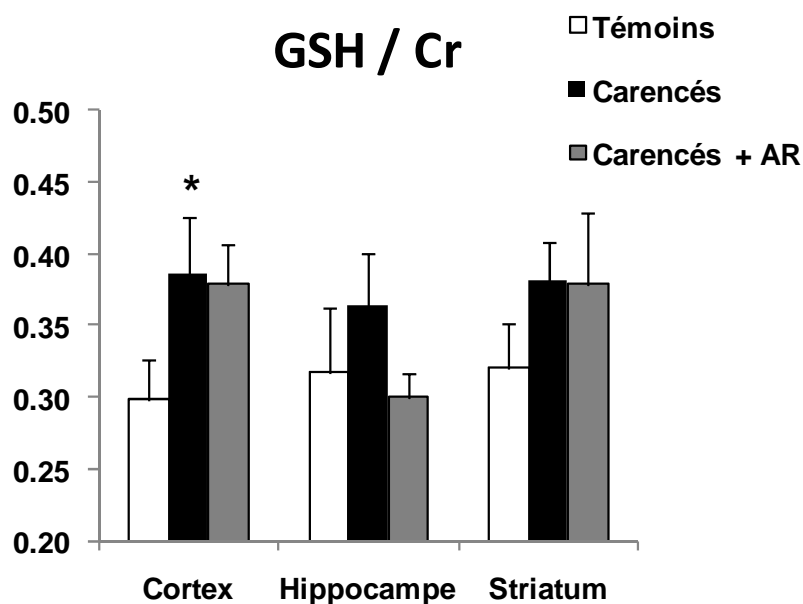
#### 3.3.3.1 Effet d'une administration d'AR sur les marqueurs des neurones et du statut antioxydant

Dans le cortex, l'administration d'AR chez les rats VAD diminue le rapport NAA/Cr (-12%,  $P=0,025$ ) qui revient alors au niveau des témoins non carencés (**Figure 2**). A l'inverse dans l'hippocampe, l'AR augmente le rapport NAA/Cr (+15%,  $P=0,05$ ) chez les carencés.

Aucun effet significatif de l'AR sur le rapport GSH/Cr n'est observé dans les trois structures (**Figure 3**).



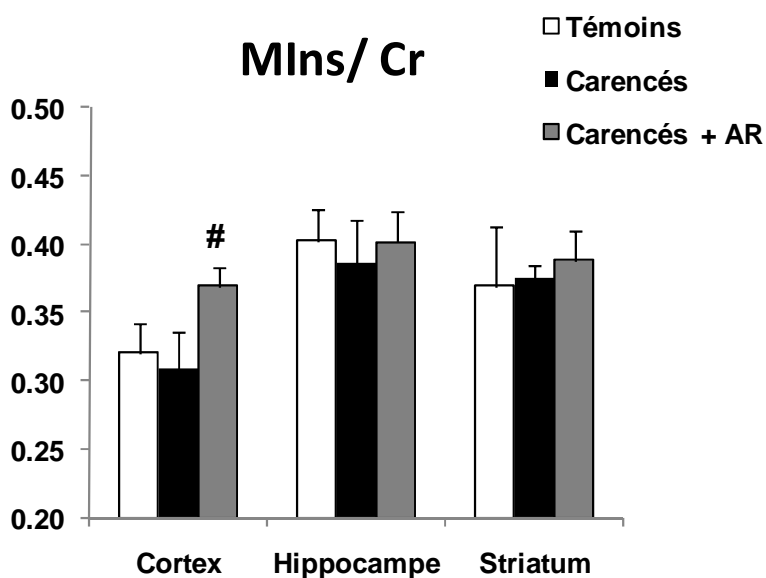
**Figure 2 :** Effet d'une carence en vitamine A de 10 semaines et de l'administration d'AR sur le rapport NAA/Cr dans le cortex, l'hippocampe et le striatum de rats Wistar. Moyennes±ESM (n=5 pour chaque groupe) ; \* $P\leq 0.05$  entre témoins et carencés ; # $P\leq 0.05$  entre carencés et carencés +AR.



**Figure 3 :** Effet d'une carence en vitamine A de 10 semaines et de l'administration d'AR sur le rapport GSH/Cr dans le cortex, l'hippocampe et le striatum de rats Wistar. Moyennes $\pm$ ESM (n=5 pour chaque groupe) ; \*P $\leq$ 0.05 entre témoins et carencés.

### 3.3.3.2 Effet de l'administration d'AR sur le marqueur glial (Myo Inositol)

L'AR augmente le rapport MIns/Cr spécifiquement dans le cortex des animaux aussi bien chez les rats carencés que chez les rats non carencés (C vs CAR : +19%, P=0,041; T vs TAR : +31%, P=0,024) (**Figure 4**).



**Figure 4 :** Effet d'une carence en vitamine A de 10 semaines et de l'administration d'AR sur le rapport MIns/Cr dans le cortex, l'hippocampe et le striatum de rats Wistar. Moyennes $\pm$ ESM (n=5 pour chaque groupe) ; #P $\leq$ 0.05 entre carencés et carencés +AR

### 3.3.3.3 Effet de l'administration d'AR sur les marqueurs d'intégrité membranaire (Cho) et d'osmolarité (Tau)

Dans le cortex et le striatum, l'administration d'AR tend à augmenter le rapport Cho/Cr seulement chez les non carencés (CX: +43%, P=0,059; S: +31%, P=0,065). Par ailleurs, cette administration a une tendance modeste à diminuer le rapport Tau/Cr dans les trois structures seulement chez les rats carencés (CX: -17%, P=0,068 ; H: -21%, P=0,078 ; S: -21%, P=0,085) (**Tableau 1**).

## 3.4 Discussion

Le premier objectif de ce travail a été d'évaluer les changements des profils neuro-métaboliques induits par une durée de 10 semaines de carence en vitamine A afin de trouver des marqueurs précoces potentiels de la pathologie. Le deuxième objectif a été de vérifier la spécificité d'action de l'acide rétinoïque sur ces paramètres métaboliques.

### 3.4.1 Effet de la carence :

La durée de 10 semaines de carence en vitamine A affecte principalement le cortex et entraîne une augmentation du rapport NAA/Cr et GSH/Cr, ce dernier tendant également à augmenter dans le striatum.

#### 3.4.1.1 Effet de la carence sur le marqueur du statut antioxydant

Le glutathion présent dans le cerveau, principalement sous forme réduite, est localisé majoritairement dans les astrocytes, compartiment majeur de la glie qui fait d'eux des acteurs essentiels du stress oxydatif (Cooper and Kristal 1997; Drukarch et al. 1998; Dringen et al. 2000). Le glutathion joue un rôle primordial dans la défense contre les radicaux libres oxygénés (RLO) à l'origine du stress oxydatif. Comparativement autres organes, le cerveau produit de grandes quantités de RLO du fait de sa forte activité respiratoire. Le système du glutathion est constitué d'une forme réduite GSH qui prend en charge les RLO pour donner la forme oxydée GSSG qui sera régénérée. La RMN du proton ne permet pas de distinguer les éléments du couple GSH+GSSG, qui est évalué ici par 1H HRMAS, et l'interprétation des données n'est jamais univoque quant à la prédominance de l'état oxydé ou réduit puisqu'il n'y a pas d'évaluation de la vitesse de changement d'état du couple. Cependant une augmentation quantitative du couple peut être analysée comme une réaction adaptative à une forte production radicalaire, et une diminution traduirait une insuffisance à lutter contre les RLO. Ainsi, des niveaux réduits de GSH ont été retrouvés dans la plupart des pathologies de type neurodégénératives (Sian et al. 1994; Dedeoglu et al. 2004) ainsi qu'au cours du vieillissement (Chen et al. 1989). Ici, l'augmentation du rapport GSH/Cr dans le cortex après

10 semaines de régime dépourvu de vitamine A, pourrait être expliquée par un mécanisme mis en place par le cerveau afin combattre la production de RLO potentiellement produits lors de la carence. Des liens ont pu être établis entre rétinoides et glutathion par l'équipe de Wu *et al* (Wu *et al.* 2004) qui ont montré que RXR $\alpha$  régule l'expression d'enzymes du métabolisme du GSH. Dans la MA, il a été montré que les ROL accélèrent l'agrégation *in vitro* des peptides A $\beta$ . Par ailleurs, des liens forts ont été établis entre inflammation et MA, l'inflammation participerait à la MA (Heneka and O'Banion 2007) en générant des ROL. De manière intéressante, il a été montré que l'inflammation chez le rat entraîne une hyporétinolémié (Gieng *et al.* 2007). Nous supposons que la hausse de GSH observée dans le cortex chez les rats carencés suggèrerait une augmentation des ROL due à la carence qui participerait à la neuroinflammation.

#### 3.4.1.2 Effet de la carence sur le marqueur neuronal

Alors qu'après 14 semaines de carence, une diminution significative avait été observée dans le cortex, l'hippocampe et le striatum des rats (Ghenimi Rahab N 2009) une durée de 10 semaines d'avitaminose A induit, de manière inattendue une augmentation du NAA/Cr dans le cortex des animaux. Le rôle du NAA dans la littérature reste encore mal cerné, ainsi plusieurs rôles hypothétiques lui ont été attribués comme celui de régulateur osmotique, de source d'acétate pour la synthèse de myéline dans les cellules gliales, de précurseur direct du NAAG neuromédiateur cérébral ou encore de facilitateur du métabolisme énergétique dans les mitochondries neuronales. En RMN, il est admis comme étant un bon marqueur de la densité et de l'intégrité neuronale car présent seulement dans les neurones et non dans les cellules gliales (Simmons *et al.* 1991; Kalra *et al.* 1998; Jenkins *et al.* 2000; Uylings and de Brabander 2002) le rapport NAA/Cr est retrouvé diminué dans la plupart des pathologies de types neurodégénératives (Choi *et al.* 2007). Bien qu'initialement considéré comme un marqueur stable, le NAA est aussi référencé comme un marqueur sensible de la fonction et de la viabilité neuronale (Moore and Galloway 2002). Cependant une hausse du NAA est observée dans le cas de la maladie de Canavan, maladie génétique développée pendant l'enfance, et serait associée à une démyélinisation progressive cérébrale. Par ailleurs, il a récemment été montré que le taux de synthèse de NAA est modestement augmenté chez certains patients MA (Harris *et al.* 2006; Moffett *et al.* 2007). Les auteurs suggèrent la mise en place de processus adaptatifs compensatoires dans les neurones des malades. Ce type de mécanisme adaptatif compensatoire (allostasique) pourrait apparaître dans le cortex à la 10 semaines de carence afin d'entraver la mise en place du processus pathologique, alors qu'après 14 semaines de carence les dégâts métaboliques caractérisés par une diminution drastique du rapport NAA/Cr sont irréversibles (Ghenimi Rahab N 2009).

#### 3.4.2 Spécificité d'action de l'acide rétinolique

Le second objectif de ce travail était de préciser la spécificité d'action de l'acide rétinolique sur le profil neuro-métabolique cérébral par l'étude des effets d'une administration d'AR chez les rats carencés en vitamine A et chez des rats non carencés. Nos résultats montrent qu'une administration d'AR à la dose de 150 $\mu$ g/kg pendant 4 jours suffit à modifier certains marqueurs du métabolisme dans les trois structures cérébrales étudiées.

#### 3.4.2.1 Effet de l'AR sur NAA/Cr :

L'administration d'AR chez les rats carencés possède des effets différentiels sur NAA/Cr selon la structure cérébrale, en particulier une augmentation dans l'hippocampe et une diminution dans le cortex. Son action sur le NAA cortical semble de nature régulatrice en restaurant un niveau semblable à celui observé chez le rat non carencé. Cependant, l'accroissement du NAA dans l'hippocampe après l'administration d'AR, observé aussi bien chez le carencé que le non carencé serait plutôt liée à une grande susceptibilité de réponse de la structure hippocampique étant connue pour être particulièrement sensible à l'effet des rétinoïdes (*Etchamendy et al. 2001; Mingaud et al. 2007; Bonnet et al. 2008; Mingaud et al. 2008*).

#### 3.4.2.2 Effet de l' AR sur MIns/Cr :

Le myo-inositol est synthétisé à partir du glucose dans plusieurs tissus (*Beemster et al. 2002*). Dans le cerveau, le myoinositol est considéré comme un marqueur des cellules gliales (dont une grande partie est constituée d'astrocytes) qui sont 1 à 10 fois plus nombreuses que les neurones. Le rapport varie selon les zones du cerveau (*O'Kusky and Colonnier 1982*) et augmente avec la phylogénie et la complexité du cerveau (*Nedergaard et al. 2003*). Ainsi l'hippocampe chez le rat est caractérisé par une quantité plus importante de cellules gliales que dans le striatum. L'administration d'AR aux rats entraîne une augmentation du MIns, particulièrement prononcée dans le cortex des animaux carencés ou non en vitamine A, et une très légère tendance à l'augmentation dans le striatum et l'hippocampe des témoins. Ce phénomène pourrait traduire une augmentation de la proportion de cellules gliales ou une stimulation « pharmacologique » de la synthèse de myo inositol. Cette action plutôt « pharmacologique » de l'AR reste à expliquer et pourrait être associée aux inositol phosphoglycanes (IPG) médiatrices de l'action de l'insuline sur le métabolisme glucidique (*Kawa et al. 2003*).

#### 3.4.2.3 Effet de l'AR sur Cho/Cr :

La Choline est un marqueur de l'intégrité des membranes cellulaires. En outre, une corrélation entre le pic de choline et la quantité d'Acétylcholine a été récemment établie (*Wang et al. 2008*). 98% de la Choline détectable en RMN correspond à la Glycérophosphatidyl choline et la Phosphatidyl choline. La traduction de ses modifications quantitatives reste ambiguë. La tendance à l'augmentation de la choline observée après administration d'AR chez les rats témoins pourrait indiquer un accroissement de la synthèse membranaire et de la prolifération cellulaire (*Ramin et al. 2003*) aussi bien qu'une altération de l'intégrité membranaire.

#### 3.4.2.4 Effet de l' AR sur Tau/Cr :

La Taurine est un acide aminé connu pour être un marqueur des variations osmotiques (*Taylor et al. 1995*). En effet, *Davies et al. (1998)* ont montré que dans des cultures cellulaires, un choc hypo osmotique entraînait une augmentation d'un facteur 20 de Taurine.

Tau/Cr est augmenté dans les cerveaux de rongeurs atteints de pathologies de type neurodégénératives (*Dedeoglu et al. 2004*). Bien que l'atrophie cérébrale et l'augmentation du

volume ventriculaire puissent éventuellement être corrélatives de perturbation de l'équilibre osmotique, la diminution de Tau/Cr sous l'action de l'AR chez les rats carencés n'apparaît pas significative.

### 3.5 Conclusion

Nos résultats montrent qu'une dérégulation de la voie de signalisation des rétinoïdes par carence vitaminique A a des conséquences précoces sur le métabolisme cérébral principalement au niveau du cortex caractérisées par une augmentation du NAA/Cr et du GSH/Cr. L'administration d'AR est régulatrice dans le cortex en rétablissant le niveau du seul NAA/Cr. Nous suggérons, à 10 semaines de carence, que la hausse des rapports NAA/Cr et GSH/Cr dans le cortex traduit la mise en place de mécanismes adaptatifs compensatoires de type allostasiques cherchant à entraver le processus pathologique. Après 14 semaines de carence, l'installation de processus pathologiques est alors caractérisée par une diminution drastique du rapport NAA/Cr dans les trois structures associés à une atrophie cérébrale et une augmentation des espaces ventriculaires (*Ghenimi Rahab N 2009*). Il reste maintenant à préciser si cette régulation existe au niveau moléculaire ce qui fera l'objet du prochain chapitre.

# CHAPITRE III

## CARENCE VITAMINIQUE A ET PROCESSUS AMYLOIDOGENE

### 1. Contexte scientifique

Divers arguments bibliographiques rapportés précédemment suggèrent l'intervention des rétinoïdes dans les processus neurodégénératifs associés à la maladie d'Alzheimer. L'expression de nombreux gènes impliqués dans la formation des peptides A $\beta$ , et conséquemment dans la formation des dépôts amyloïdes qui participent à la formation des plaques séniles caractéristiques de la maladie, est régulée par les récepteurs de l'acide rétinoïque. Parmi ces gènes cibles, on peut citer ceux codant pour la protéine précurseur des dépôts amyloïdes ou APP, pour les enzymes  $\alpha$ -,  $\beta$ - et  $\gamma$ -sécrétase qui clivent la protéine APP, et pour les protéines ApoD et IDE qui jouent un rôle déterminant dans le devenir des peptides A $\beta$  nouvellement formés. Ces données plaident en faveur d'une intervention de la vitamine A dans les mécanismes biochimiques à l'origine de la formation des dépôts amyloïdes.

Les données présentées dans l'introduction bibliographique démontrent le rôle d'une baisse de l'activité de la voie de signalisation des rétinoïdes dans la genèse de troubles neurobiologiques et cognitifs du sujet âgé. Comme nous l'avons déjà montré, le modèle de carence en vitamine A, qui prétend modéliser la diminution naturelle de la biodisponibilité en vitamine A liée à l'âge, induit des altérations neurobiologiques (plasticité synaptique et neurogénèse hippocampique) et mnésiques comparables à celles observées lors du vieillissement normal. Ces résultats déjà obtenus dans le laboratoire, associés aux données de la littérature concernant l'implication des rétinoïdes dans la genèse de la maladie d'Alzheimer nous ont conduit à émettre l'hypothèse de travail selon laquelle une carence prolongée en vitamine A, en modulant l'expression de gènes cibles, pourrait modifier l'équilibre entre les voies physiologique et amyloïdogénique de dégradation de l'APP et ainsi induire des modifications biochimiques caractéristiques de la MA et notamment celles inhérentes au processus amyloïdogène.

### 2. Effet d'une carence vitaminique A de 10 et 13 semaines sur l'expression des récepteurs de l'AR et celle de certains marqueurs du processus amyloïdogène

Dans ce contexte, une première étude a eu pour objectif d'étudier l'effet d'une carence en vitamine A, modérée ou prolongée, suivie ou non d'une administration d'AR sur l'expression des RAR, des isoformes APP695 et APP770-751 dans le cerveau entier des rats. L'expression de ces protéines associée à celles de BACE et des différents fragments APP-CTF résultant du clivage de différentes sécrétase dont la BACE (i.e. APP- $\beta$ CTF, APP- $\beta'$ CTP, APP- $\alpha$ CTF, et leurs formes phosphorylées) a également été mesurée dans l'hippocampe, le

striatum et le cortex de rats soumis à une carence prolongée. *Ce travail a fait l'objet de la publication N°3.*

### 2.1. Méthodologie utilisée :

Des rats au sevrage ont été divisés en 2 lots, témoins et carencés, selon leur régime alimentaire. Après 10 ou 13 semaines de régime dépourvu en vitamine A, une partie des rats carencés a reçu, par injection sous-cutanée, 150 $\mu$ g d'AR/kg/j et pendant 4 jours.

L'expression des RAR, des isoformes de l'APP et de la BACE a été mesurée par RT-PCR en temps réel, tandis que le taux des fragments APP-CTF a été quantifié par western-blot.

### 2.2. Principaux résultats et discussion

Les résultats montrent que l'hypoexpression des récepteurs de l'AR associée à la carence vitaminique A s'accompagne d'une diminution de l'expression d'APP-695, de BACE et des différentes formes phosphorylées du fragment APP-CTF uniquement dans le cerveau entier et le cortex des rats soumis à un régime dépourvu de vitamine A pendant 13 semaines.

Nos résultats suggèrent qu'une carence prolongée conduit à une modification du processus de dégradation de l'APP. Il semble que l'état de carence induise un basculement progressif de la voie physiologique vers la voie amyloïdogénique. En effet, cette étude met en évidence une augmentation significative du rapport des transcrits APP770-751/APP695 entre les deux durées de carence, dans le cerveau entier et dans le cortex des rats. Or, sur des tissus humains obtenus *post-mortem*, une augmentation du rapport des transcrits APP751/APP695 a été montrée dans l'hippocampe de sujets atteints de la maladie d'Alzheimer par rapport aux sujets témoins (*Johnson et al. 1990*). Les rapports étudiés dans ces deux études sont comparables puisque l'isoforme 770 est en quantité négligeable chez le rat (et non chez l'homme) (*Sola et al. 1993*).

D'après (*Edelberg and Wei 1996*), la voie amyloïdogénique est privilégiée chez les sujets atteints de la maladie d'Alzheimer au détriment de la voie physiologique. La diminution du taux du fragment APP- $\alpha$ CTF laisse supposer que la voie physiologique n'est pas favorisée en situation de carence vitaminique A. Par ailleurs, les données de la littérature rapportent que les formes phosphorylées du fragment APP- $\beta$ CTF, sont des substrats privilégiés de la  $\gamma$ -sécrétase (*Vingtdeux et al. 2005*). Aussi, la diminution du taux protéique de ces différentes formes suggère une augmentation du peptide A $\beta$  via une augmentation de l'activité de la  $\gamma$ -sécrétase, ce qui est en accord avec les données de la littérature (*Holback et al. 2005; Prinzen et al. 2005*).

La spécificité de réponse du cortex peut paraître surprenante, cependant de nombreux auteurs ont montré qu'en dépit de la vulnérabilité de l'hippocampe dans la maladie d'Alzheimer (*Mishizen-Eberz et al. 2004*), les premières altérations de la voie de dégradation de la protéine APP apparaissent au niveau du cortex (*Vickers et al. 2000; Thal and Braak 2005*).



L'administration d'AR normalise le taux d'ARNm codant pour les récepteurs RAR et BACE ainsi que le taux protéique des différents fragments APP-CTF. Ainsi, après 13 semaines de régime carencé en vitamine A, l'administration d'AR paraît restaurer un équilibre entre la voie constitutive et la voie amyloïdogénique et prévenir de ce fait les dysfonctionnements de type dégénératifs.

*L'ensemble de ces résultats suggère une implication de la vitamine A dans les processus impliqués dans l'apparition des dépôts amyloïdes à l'origine de la formation des plaques séniles observées dans la maladie d'Alzheimer. Ces résultats confortent les données montrant qu'une carence prolongée en vitamine A peut conduire à l'apparition de dépôts A $\beta$  chez le rat adulte (Corcoran et al. 2004). Ces données suggèrent que ce modèle de carence en vitamine A, qui vise à modéliser la diminution naturelle de la biodisponibilité en vitamine A liée à l'âge, induit dans un premier temps des altérations neurobiologiques et mnésiques semblables à celles observées lors du vieillissement normal, puis si la carence se prolonge, fait basculer certains processus vers des dysfonctionnements de types dégénératifs. La suite du travail a donc consisté à préciser ces dysfonctionnements. Afin de privilégier la mise en place de ces modifications, l'étude a été menée sur des animaux soumis à une carence prolongée de 14 semaines.*

# Publication 2



ELSEVIER

---

**Neurobiology  
of Disease**


---

 www.elsevier.com/locate/ynbdi  
 Neurobiology of Disease 23 (2006) 1–10

## Retinoic acid normalizes nuclear receptor mediated hypo-expression of proteins involved in $\beta$ -amyloid deposits in the cerebral cortex of vitamin A deprived rats

 Marianne Husson,<sup>a,1,2</sup> Valérie Enderlin,<sup>a,\*</sup> André Delacourte,<sup>b,3</sup> Nadirah Ghenimi,<sup>a,1</sup>  
 Serge Alfos,<sup>a,1</sup> Véronique Pallet,<sup>a,1</sup> and Paul Higuieret<sup>a,1</sup>
<sup>a</sup>Unité de Nutrition et Signalisation Cellulaire (E.A. MENRT; USC INRA) ISTAB, Université Bordeaux I, Avenue des Facultés, 33405 Talence cedex, France  
<sup>b</sup>Unité Vieillesse Cérébrale et Dégénérescence Neuronale, INSERM U422, 1 place de Verdun, 59045 Lille, France

 Received 20 October 2005; revised 19 January 2006; accepted 27 January 2006  
 Available online 10 March 2006

Recent data have revealed that disruption of vitamin A signaling observed in Alzheimer's disease (AD) leads to a deposition of  $\beta$ -amyloid (A $\beta$ ). The aim of this study was to precise the role of vitamin A and its nuclear receptors (RAR) in the processes leading to the A $\beta$  deposits. Thus, the effect of vitamin A depletion and subsequent administration of retinoic acid (RA, the active metabolite of vitamin A) on the expression of RAR $\beta$ , and of proteins involved in amyloidogenic pathway, e.g., amyloid precursor protein (APP),  $\beta$ -secretase enzyme (BACE), and APP carboxy-terminal fragment (APP-CTF) was examined in the whole brain, hippocampus, striatum, and cerebral cortex of rats. Rats fed a vitamin A-deprived diet for 13 weeks exhibited decreased amount of RAR $\beta$ , APP695, BACE, and of APP-CTF in the whole brain and in the cerebral cortex. Administration of RA is able to restore all expression. The results suggest that fine regulation of vitamin A mediated gene expression seems fundamental for the regulation of APP processing.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Vitamin A deficiency; Retinoic acid nuclear receptor (RAR); Amyloid precursor protein (APP);  $\beta$ -Site APP-cleaving enzyme (BACE); APP carboxy-terminal fragment (CTF); Rat cerebral cortex

### Introduction

Retinoic acid (RA), the active metabolite of vitamin A, mediates its effect by inducing or repressing transcription of genes through binding to specific nuclear receptors which are transcription factors: RAR (whose ligands are the *all-trans* RA and *9-cis*

RA isomers) and RXR (whose ligand is the *9-cis* RA isomer) (Marill et al., 2003). It is well-known that retinoids, and particularly retinoic acid, play a critical role in a variety of essential life processes, including reproduction, embryonic development, and modulation of the growth and differentiation of a wide variety of mammalian cell types (Bonet et al., 2003).

Presently, the role of retinoids in the adult central nervous system is less conspicuous than their role in development and has only recently attracted scientific attention. Some data suggest that fine regulation of retinoid mediated gene expression seems fundamentally important for optimal brain functioning such as LTP, synaptic plasticity, learning, and memory (Enderlin et al., 1997; Chiang et al., 1998; Etchamendy et al., 2001, 2003; Misner et al., 2001; Cocco et al., 2002). Similarly, changes at the retinoid level appear capable of producing alterations in neuronal target proteins and consequently may affect physiological maintenance processes in the mature brain (Malik et al., 2000; Lane and Bailey, 2005). Among the many genes whose expression is regulated by RA, there are those coding for their own nuclear (Yamagata et al., 1993) receptors and those coding for neuron-specific proteins involved in many activities in the mature brain, e.g., nerve growth factor (Fiorentini et al., 2002), *N*-methyl-D-aspartate receptor (Beczowska et al., 1996), dopamine receptor 2 (Farooqui, 1994), choline acetyltransferase (Kobayashi et al., 1994), neurogranin (Iñiguez et al., 1994).

Recently, data from a number of studies have argued for the involvement of retinoid signaling in the etiology of Alzheimer's disease (AD) (Goodman and Pardee, 2003; Corcoran et al., 2004). This disease is characterized by the presence of two major pathologic lesions, neuritic plaques, and neurofibrillary tangles. Neuritic plaques are composed of extracellular fibrillar deposits of  $\beta$ -amyloid peptide. The involvement of APP, an integral membrane glycoprotein, in the mechanisms of these deposits is well documented (Neve et al., 1990; Sinha, 2002). The APP gene undergoes alternative splicing to yield three major mRNA transcripts, APP770, APP751, and APP695 with two minor transcripts,

\* Corresponding author. Fax: +33 5 40 00 27 76.

E-mail address: v.enderlin@istab.u-bordeaux1.fr (V. Enderlin).

<sup>1</sup> Fax: +33 5 40 00 27 76.

<sup>2</sup> These authors have contributed equally to this work.

<sup>3</sup> Fax: +33 3 20 62 20 72.

Available online on ScienceDirect (www.sciencedirect.com).

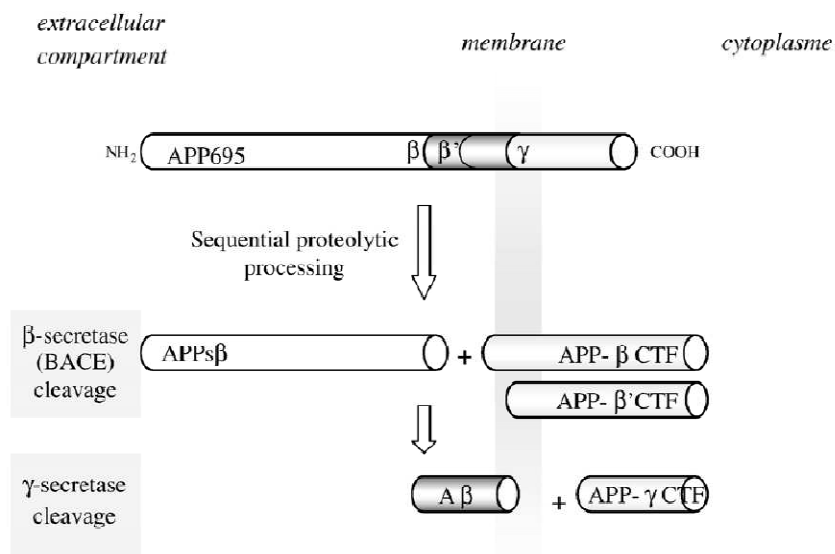


Fig. 1. Schematic representation of the APP amyloidogenic pathway. The  $\beta$ -secretase (BACE) cleaves APP695 leading to the secreted form of APP (APPs $\beta$ ) and to the carboxy-terminal fragments (APP- $\beta$ CTF and APP- $\beta'$ CTF). The latter are cleaved by the  $\gamma$ -secretase complex, which generates a carboxy-terminal fragment ( $\gamma$ CTF) and the peptide A $\beta$ .

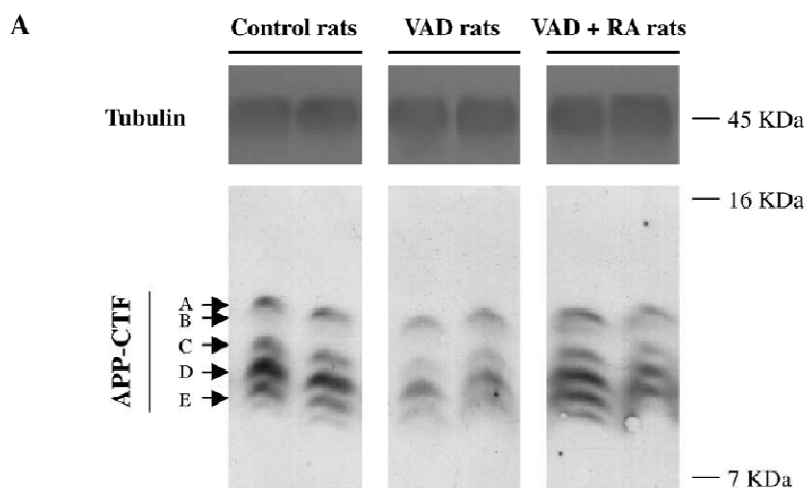
APP563, and APP714 (Tanzi et al., 1988). The APP770 and APP751 isoforms are protected by the presence of the Kunitz protease inhibitor (KPI) domain, whereas the APP695 isoform, lacking this KPI domain, undergoes amyloidogenic pathway-related sequential proteolytic processing by  $\beta$ - and  $\gamma$ -secretases, generating the  $\beta$ -amyloid peptide (A $\beta$  peptide) (Leblanc et al., 1996; Simons et al., 1996; Gao and Pimplikar, 2001) (Fig. 1). The more amyloidogenic fragment A $\beta$ <sub>1–42</sub> aggregates and forms the nidus of plaque leading to cell death (Dugué et al., 2003). The recently identified enzyme BACE is the major  $\beta$ -secretase responsible for generation of A $\beta$  peptides by neurons (Cai et al., 2001; Bodendorf et al., 2002). This enzyme leads to the cleavage of the APP ectodomain at the N-terminus region, producing membrane-bound C-terminal fragments (APP- $\beta$ CTF and APP- $\beta'$ CTF), the direct precursors of A $\beta$  (Evin et al., 2003). APP-CTF is considered to be a potential early marker for the biological diagnosis of AD (Sergeant et al., 2002). Interestingly, several studies have shown that expression of some of AD-related genes are under control of RA in the brain, e.g.,  $\beta$ -site APP-cleaving enzyme (BACE) (Sato and Kuroda, 2000), amyloid precursor protein (APP) (Hung et al., 1992; Yang et al., 1998; Murray and Ihwe, 2003), or  $\alpha$ -synuclein, a non-A $\beta$  component of amyloid plaques (Sato and Kuroda, 2001). Moreover, recent studies have revealed a decrease in serum retinol in AD patients (Bourdell-Marchasson et al., 2001; Rinaldi et al., 2003). Some authors have reported that (i) hypo-functioning of retinoid signaling pathway is a key factor in development of AD (Goodman and Pardee, 2003),

and (ii) disruption of retinoid signaling causes deposition of  $\beta$ -amyloid in the adult brain (Corcoran et al., 2004). Finally, vitamin A or retinoid seems to impair and destabilize preformed A $\beta$  aggregates and consequently seems to protect against plaque formation, probably via its nuclear receptors (Ono et al., 2004; Sahin et al., 2005). Such effects of vitamin A are of primary importance in that attenuating A $\beta$  mediated neuro-degeneration is, today, of major consideration in a potential treatment for AD.

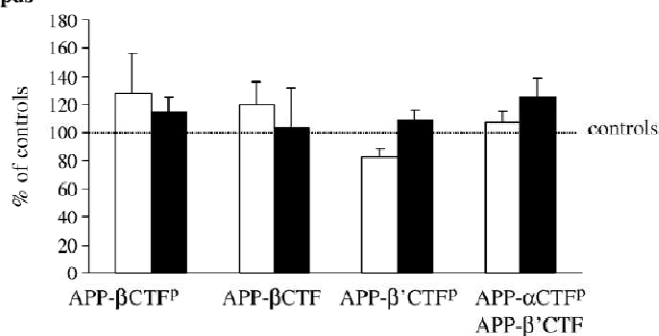
Thus, in the present study, the role of vitamin A, and its receptors, in the processes leading to amyloid deposits was studied *in vivo*. Therefore, using a model of postnatal vitamin A deprivation, the effect of a vitamin A-free diet, with or without administration of RA, on the amount of mRNA of RA nuclear receptor (RAR $\beta$ ) and on three target genes involved in amyloid deposits (APP695 and APP770-751 and the  $\beta$ -secretase BACE) in the whole brain and in hippocampus, striatum, and cortex of adult rat was evaluated. We have choice to favor, in this study, the quantification of RAR $\beta$  mRNA since this isoform (i) is the major receptor in the adult brain (Maret et al., 2005), (ii) seems up-regulated by its own ligand in several organs including brain (Kato et al., 1992; Yamagata et al., 1993; Alfos et al., 2001), and (iii) is implicated in optimal adult brain functioning (Chiang et al., 1998; Enderlin et al., 1997; Etchamendy et al., 2001, 2003; Husson et al., 2004).

The levels of mRNA were measured using a real-time polymerase chain reaction (PCR). Moreover, using a Western blot analysis, the amount of APP carboxy-terminal fragment (APP-

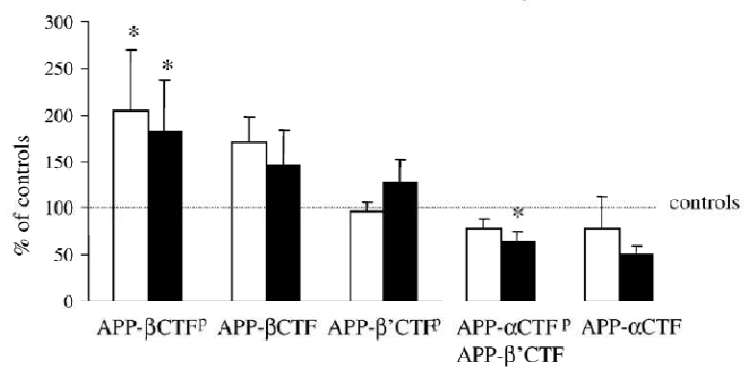
Fig. 2. Western blot analysis of APP-CTF in 13-week vitamin A deprived rats treated with RA or not. (A) Example of Western blot analysis of tubulin and APP-CTF in the cortex of control rats, vitamin-A-deficient rats (VAD rats) and VAD rats treated by RA (VAD + RA rats). The five bands for the APP-CTF correspond to (A) phosphorylated form of APP- $\beta$ CTF (APP- $\beta$ CTF<sup>p</sup>); (B) APP- $\beta$ CTF; (C) phosphorylated form of APP- $\beta'$ CTF (APP- $\beta'$ CTF<sup>p</sup>); (D) phosphorylated form of APP- $\alpha$ CTF (APP- $\alpha$ CTF<sup>p</sup>) and APP- $\beta'$ CTF; (E) APP- $\alpha$ CTF. (B) Abundance of phosphorylated APP- $\beta$ CTF (APP- $\beta$ CTF<sup>p</sup>), APP- $\beta$ CTF, phosphorylated APP- $\beta'$ CTF (APP- $\beta'$ CTF<sup>p</sup>), phosphorylated APP- $\alpha$ CTF + APP- $\beta'$ CTF (APP- $\alpha$ CTF<sup>p</sup>/APP- $\beta'$ CTF) and APP- $\alpha$ CTF in the hippocampus, striatum, and cerebral cortex of 13-week vitamin A deprived rats treated with RA or not. Data represent mean values of measures performed on five animals ( $n = 5$ ), with the standard error represented by vertical bars. \*Mean value was significantly different from control rats ( $P < 0.05$ ). □ Depleted. ■ Depleted + RA.



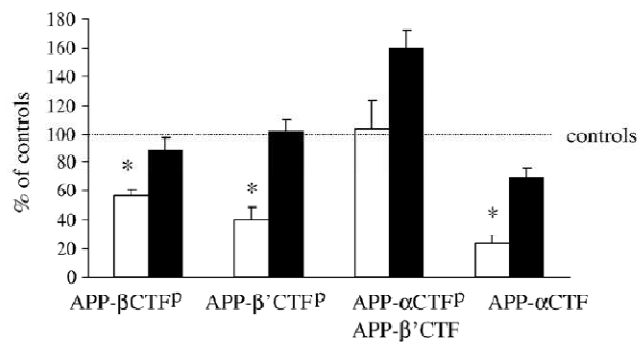
**B Hippocampus**



**Striatum**



**Cortex**



CTF), considered to be an indicator of biological diagnosis of AD, was quantified.

## Materials and methods

### Experimental design

The study was conducted in accordance with the European Communities Council Directives (861609/EEC). All the experiments conformed to the Guidelines on the Handling and Training of Laboratory Animals. The experimental design of postnatal vitamin A deficiency was the same as that described by Husson et al. (2003). Weaned male Wistar rats were purchased from Harlan (Gannat, France). They were maintained in a room with a constant airflow system, controlled temperature (21–23°C) and a 12 h light/dark cycle. The rats were allowed ad libitum access to food and tap water and divided into two experimental groups: vitamin A deficient (twenty animals); control (ten animals). The control diet was the same as the vitamin-A-deficient diet plus vitamin A (1515.15 ER/kg diet).

Animals were fed these diets for 10 or 13 weeks. At this time, some of depleted rats were injected daily (150 µg/kg body weight) for 4 days with retinoic acid (*all-trans* RA; Sigma no. R2625) or vehicle only. Control rats were injected with vehicle. RA was dissolved in a mixture containing polyethyleneglycol/NaCl/ethanol (70/20/10).

### Quantification of mRNA

Rats of the different groups (controls rats, VAD rats, and VAD rats treated by RA) were sacrificed by decapitation. The brain was rapidly removed and stored at –80°C or individual sections (hippocampus, striatum, and cerebral cortex) were dissected out and then stored at –80°C for subsequent analysis.

Extraction of RNA was conducted using an extraction kit (RNA plus, Q.BIO gene, Illkirch, France). The preparation of cDNA and quantification of mRNA by real-time PCR were performed as described in previous studies (Husson et al., 2003; Redonnet et al., 2002). The oligonucleotides primers for GAPDH (housekeeping gene) and RARβ are the same as those previously used (Husson et al., 2004). The forward and reverse primer sequences for APP695 were 5'-TGGAGGAGGTAGTCCGAGTCCC, nt 863–885 and 5'-CTCTTTGGCTTTCTGGAAATGGG, nt 978–956 (Shivers et al., 1988), for APP770–751 were 5'-CTCCCGCTGGTACTTTGATGT-CAC, nt 937–960 and 5'-CTCTTTGGCTTTCTGGAAATGGG, nt 1213–1191 (Feng et al., unpublished), for BACE were 5'-AGACGCTCAACATCCTGGTG, nt 684–703 and 5'-CCTGGGTGTAGGGCACATAC, nt 830–811 (Kitazume et al., 2003). Primers were purchased from Genset (Paris, France). The results were normalized by the ratio of the relative concentration of target to that of GAPDH in the same sample.

### Western blot analysis

Rats of the different groups (controls rats, VAD rats, and VAD rats treated by RA) were sacrificed by decapitation. The brain was rapidly removed, and individual regions (hippocampus, striatum and cerebral cortex) were dissected out and stored at –80°C for subsequent analysis.

Western blot analysis was performed as previously described (Vingtdeux et al., 2005) with minor modifications. Brain tissue of the different groups was homogenized in Laemmli sample buffer. The same quantity of total brain proteins (60 µg/lane) was loaded on a 16% Tris–Tricine SDS-polyacrylamide gel and transferred to a nitrocellulose membrane at 3 mA/cm<sup>2</sup> per gel using the semidry Trans-blot SD Bio-Rad system (170–3940) (Bio-Rad Laboratories, Munich, Germany). Proteins were reversibly stained with Ponceau Red to check the quality of the transfer. The membranes were preblocked in 0.15 M Tris–HCl pH 8.0, 1.39 M NaCl, 5% Tween-20 (v/v) and 5% (w/v) of non-fat milk for 1 h, incubated overnight at 4°C with primary antibody and incubated for 1 h at room temperature with secondary antibody. The primary antibody used (APPCTer-C17; 1/2000; a kind gift from André Delacourte, Lille, France) was a polyclonal rabbit antibody raised against the last 17 amino acids of the human APP sequence (Sergeant et al., 2002). The APP-CTF bands detected corresponded to APP-βCTF and APP-β'CTF (products of the β-secretase BACE), APP-αCTF (the α-secretase product), and to their respective phosphorylated forms, APP-βCTF<sup>P</sup>, APP-β'CTF<sup>P</sup>, and APP-αCTF<sup>P</sup> (Fig. 2A). Relative level of β-tubulin, the internal control, was determined in these experimental conditions. Immunoreactive polypeptide bands were visualized enzymatically with an alkaline phosphatase-conjugated anti-rabbit antibody. The β-tubulin antibody and the secondary antibodies were from Sigma Immunochemical (Saint Quentin Fallavier, France). The staining intensity of protein bands was determined using Quantity One, quantification software (Bio-Rad Laboratories, USA). The relative levels in proteins in VAD rats treated with RA or not were determined as a percentage of the same proteins in control rats.

### Proteins

The concentration of proteins was determined according to Bradford (1976) using a Bio-Rad protein assay (Bio-Rad Laboratories, Munich, Germany).

### Statistical analysis

Values are given as means and standard errors of the mean (SEM). The statistical significance of differences between means was calculated by ANOVA followed by an appropriate post hoc test (Fisher's LSD test) using StatGraphics Plus Software (Manugistics, Inc., USA). *P* values <0.05 were considered to be statistically significant.

## Results

Previous study showed that vitamin A-free diet consumption for 10 weeks correspond to the time course of vitamin A depletion in rat (Husson et al., 2003). Following this period, the serum retinol concentration as well as liver retinol concentration significantly decreased in vitamin A deprived rats compared to controls. Retinyl palmitate was almost undetectable in vitamin-A-deficient rat liver.

In the present study, animals were fed a vitamin A-free diet for 10 or 13 weeks, before the onset of apparent disease. Fig. 3 shows that the growth of the vitamin A deprived rats slowed down effectively after 10 weeks and reached a plateau until 13 weeks.

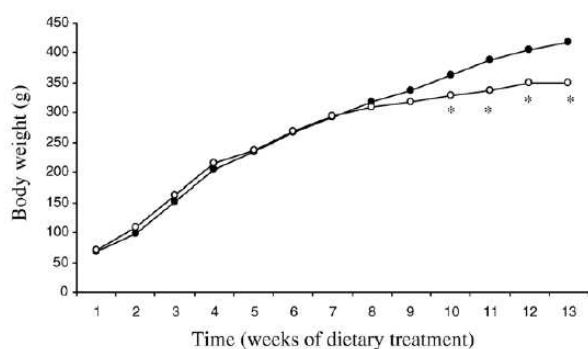


Fig. 3. Effects of a vitamin A-free diet on body weight. Each point is the mean for twelve or twenty-four rats for control or depleted animals, respectively. \*Mean value was significantly different from that of control animals. ●- Control rats. ○- Depleted rats.

#### Expression of RA nuclear receptors and target genes in the whole brain of rats deprived of vitamin A for 10 or 13 weeks treated with RA or not

The results are summarized in Tables 1 and 2.

#### Effect of vitamin A-free diet on RA nuclear receptor and amyloid precursor protein isoforms

The level of RAR $\beta$  mRNA was lower in rat brain after 10 or 13 weeks of vitamin A-free diet consumption compared to control rat brain (approximately –36% for both time periods tested).

Concerning the RA target genes, no change was observed in the mRNA levels of APP695 and APP770–751 in the brain between control and depleted groups after 10 weeks. After 13 weeks of vitamin A-free diet, the abundance of APP695 was significantly reduced (–14%), whereas the level of APP770–751 mRNA was unchanged.

#### Effects of RA administration on RA nuclear receptor and amyloid precursor protein isoforms

RA administration restored the depleted diet-related decreased mRNA level of its own nuclear receptor and of the APP695 isoform. Indeed, RA treatment up-regulated the amount of RAR $\beta$  mRNA (+33% and +46% after 10 and 13 weeks, respectively) and APP695 (+45% and +39% after 10 and 13 weeks, respectively) mRNA at least at the control level.

Table 1

Effect of vitamin A deficiency for 10 weeks on the abundance of retinoic acid receptor (RAR $\beta$ ), amyloid precursor protein (APP695, APP770–751) mRNA in the whole brain of rat

	RAR $\beta$	APP695	APP770–751
	mRNA (%mRNA GAPDH)		
Controls	0.150 $\pm$ 0.010 <sup>a</sup>	47.82 $\pm$ 1.38 <sup>a</sup>	9.45 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>
Depleted	0.096 $\pm$ 0.009 <sup>b</sup>	49.53 $\pm$ 3.61 <sup>a</sup>	8.97 $\pm$ 0.33 <sup>a</sup>
Depleted + RA	0.128 $\pm$ 0.010 <sup>a</sup>	71.55 $\pm$ 2.59 <sup>b</sup>	11.27 $\pm$ 0.38 <sup>b</sup>

Data represent mean  $\pm$  SEM of measures performed on five animals ( $n = 5$ ) using real-time PCR.

In the same column, data indicated by different letters (a–c) are significantly different,  $P < 0.05$ . Data were analyzed using post hoc Fisher test.

Table 2

Effect of vitamin A deficiency for 13 weeks on the abundance of retinoic acid receptor (RAR $\beta$ ), amyloid precursor protein (APP695, APP770–751) mRNA in the whole brain of rats

	RAR $\beta$	APP695	APP770–751
	mRNA (%mRNA GAPDH)		
Controls	0.138 $\pm$ 0.002 <sup>a</sup>	47.77 $\pm$ 1.39 <sup>a</sup>	10.24 $\pm$ 0.89 <sup>a</sup>
Depleted	0.088 $\pm$ 0.003 <sup>b</sup>	41.12 $\pm$ 0.87 <sup>b</sup>	9.37 $\pm$ 0.66 <sup>a</sup>
Depleted + RA	0.129 $\pm$ 0.006 <sup>a</sup>	57.05 $\pm$ 1.69 <sup>c</sup>	11.57 $\pm$ 0.21 <sup>b</sup>

Data represent mean  $\pm$  SEM of measures performed on five animals ( $n = 5$ ) using real-time PCR.

In the same column, data indicated by different letters (a–c) are significantly different,  $P < 0.05$ . Data were analyzed using post hoc Fisher test.

Moreover, the abundance of APP770–751 was increased by RA treatment after 10 and 13 weeks of deprived diet (+26% and +23%, respectively).

#### Expression of RA nuclear receptor and target genes in the hippocampus, striatum, and cortex of rats deprived of vitamin A for 13 weeks treated with RA or not

The results are summarized in Figs. 2B and 4.

#### Effect of vitamin A deficiency

**Effect on RA nuclear receptor.** Vitamin A deficiency was accompanied by an alteration in the level of mRNA of RAR $\beta$  in the striatum and cortex. Indeed, the amount of RAR $\beta$  was lower in the striatum (–45%) and in the cortex (–44%) of vitamin A deprived rats compared to the control rat. The level of this nuclear receptor was unquantifiable in the hippocampus.

**Effect on amyloid precursor protein isoforms.** After 13 weeks of diet, the mRNA level of APP770–751 was unchanged in all three brain regions studied of vitamin A deprived rats compared to the control animals. Regarding the amounts of APP695 mRNA, a significant decrease was observed in the vitamin A deprived rat cortex (–37%), whereas no change was noted in the hippocampus or in the striatum as compared to the controls. Table 3 shows an increase in the APP770–751/APP695 ratio in the cortex of vitamin A deprived rats compared to the controls (+36%).

**Effect on  $\beta$ -site APP cleaving enzyme.** Concerning BACE, the amount decreased (–22%) in the cortex of vitamin A deprived rats, whereas no difference was observed in the hippocampus or striatum as compared to the controls.

**Effect on C-terminal fragment of APP level.** The present data showed that VAD significantly affects the expression of APP-CTF mainly in the cortex. In this region, a significant reduction in the amount of phosphorylated APP- $\beta$ CTF (–44%), phosphorylated APP- $\beta'$ CTF (–60%) and APP- $\alpha$ CTF (–76%) isoforms was observed in vitamin A deprived relative to control rats. Surprisingly, an increased expression of phosphorylated APP- $\beta$ CTF was also observed in the striatum.

In Western blot analyses,  $\beta$ -tubulin was investigated in order to determine whether the changes in APP-CTF protein observed in

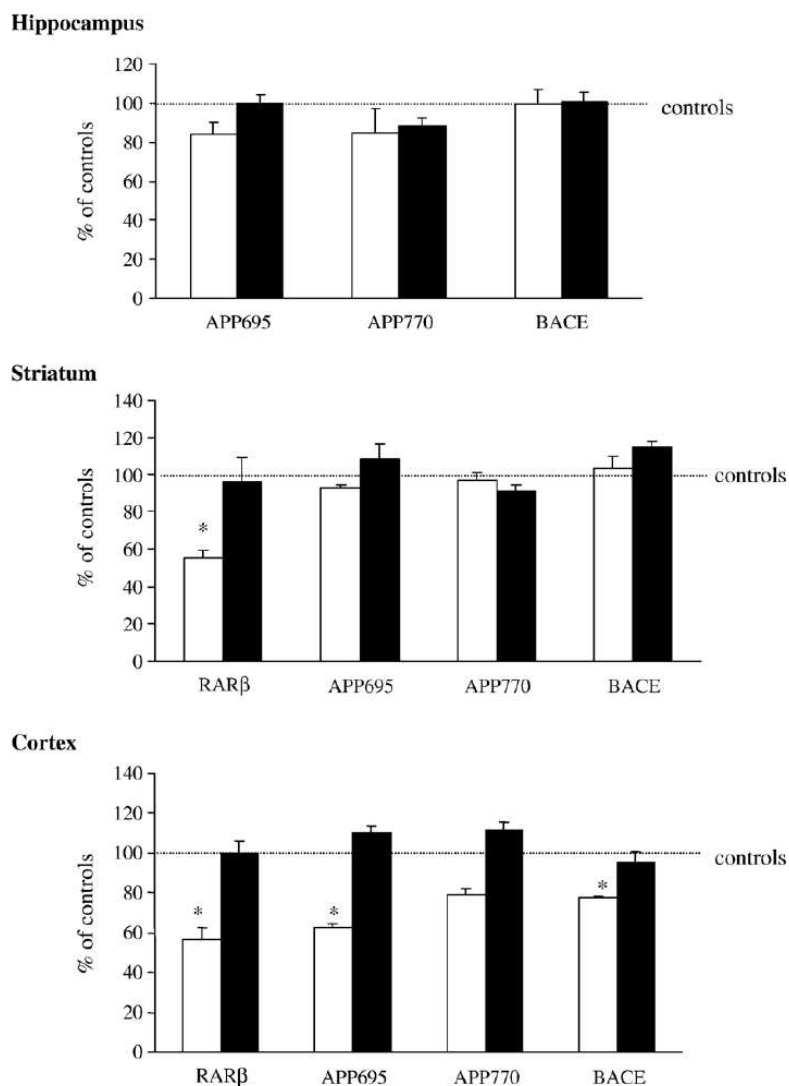


Fig. 4. Abundance of retinoic acid (RAR $\beta$ ), amyloid precursor protein (APP695, APP770–751), and  $\beta$ -secretase (BACE) mRNA in the hippocampus, striatum and cerebral cortex of 13-week vitamin A deprived rats treated with RA or not. Data represent mean values of measures performed on five animals ( $n = 5$ ), with the standard error represented by vertical bars. \*Mean value was significantly different from control rats ( $P < 0.05$ ).  $\square$  Depleted.  $\blacksquare$  Depleted + RA.

the cortex was associated with a generalized effect of dietary vitamin A restriction. Analyses of control and deprived rats revealed no significant difference in the expression of  $\beta$ -tubulin (2636 + 106 in vitamin A depleted rats versus 2611 + 123 in control rats).

#### Effect of RA administration

**Effect on RA nuclear receptor mRNA level.** Administration of RA was able to restore its own nuclear receptor mRNA levels in the striatum and cortex of vitamin A deprived rats.

**Effect on amyloid precursor protein isoforms.** The abundance of APP770–751 mRNA was unchanged by RA administration in all of the three brain regions studied. Concerning the APP695 isoform, whereas no modification was observed in the hippocampus and

striatum, RA treatment restored the depleted diet-related decreased mRNA level in the cortex.

**Effect on  $\beta$ -site APP cleaving enzyme.** The amount of BACE mRNA was significantly increased (+23%) only in the cortex of vitamin A deprived rats treated with RA.

**Effect on the level of C-terminal fragment of APP.** Administration of RA increased the protein level of APP-CTF in the region altered by depleted diet. Indeed, RA treatment restored the amount of phosphorylated APP- $\beta$ CTF, phosphorylated APP- $\beta'$ CTF, and APP- $\alpha$ CTF isoforms protein in the cortex. In the striatum, a region which presents an important variability in the concentration of the APP-CTF protein, RA significantly increased the amount of phosphorylated APP- $\beta$ CTF and decreased the amount of phosphorylated APP- $\alpha$ CTF + APP- $\beta'$ CTF isoform. The protein level of



Table 3  
Effect of vitamin A deficiency for 13 weeks on the APP770-751/APP695 mRNA ratio in the hippocampus, striatum and cerebral cortex of rats

	APP770-751/ APP695 mRNA (%mRNA GAPDH)		
	Hippocampus	Striatum	Cerebral cortex
Controls	0.234 ± 0.022	0.197 ± 0.020	0.094 ± 0.001
Depleted	0.225 ± 0.031	0.206 ± 0.011	0.128 ± 0.001*
Depleted + RA	0.198 ± 0.011	0.166 ± 0.019	0.105 ± 0.001

Data represent mean ± SEM of measures performed on five animals ( $n = 5$ ). The values show the ratio of the APP770-751 and APP695 transcripts as determined from quantification of real-time PCR.

\* Post hoc Fisher tests: \* $P < 0.05$  significantly different from control rats.

$\beta$ -tubulin was unchanged by RA treatment (2767 + 193 in vitamin A depleted rats treated with RA versus 2636 + 106 in vitamin A depleted rats).

## Discussion

The present study demonstrated that hypo-activity of the retinoid signaling pathway leads to decreased expression of APP695, BACE, and APP-CTF in whole brain and cortex of rats fed a vitamin A-free diet for 13 weeks. Administration of RA to these vitamin A-depleted rats restored the amounts of both RA nuclear receptor and related gene involved in the amyloid deposits.

### *Expression of RA nuclear receptor and target genes in the brain of rats deprived of vitamin A for 10 or 13 weeks*

As shown in our previous study after 10 weeks of diet (Husson et al., 2003), rats fed a vitamin A-free diet for 13 weeks displayed a significant hypo-expression of RAR $\beta$  in whole brain.

Whereas no modification was observed concerning the amount of APP mRNA after 10 weeks of depleted diet, alteration of the vitamin A signaling pathway was accompanied by a decreased amount of APP695 mRNA in the whole brain after 13 weeks. This decreased expression may be the result of decreased RA bioavailability together with the lower amount of RAR $\beta$ . Indeed in vitro studies have shown that the APP695 isoform may be specifically regulated by RA treatment (Hung et al., 1992; Yang et al., 1998; Murray and Ihwe, 2003). There is a longstanding controversy as to which APP transcript is up- or down-regulated in amyloidogenic diseases. Nevertheless, loss of the brain-specific APP695 has been described in the AD cortex and hippocampus (Johnson et al., 1988, 1989). Present data revealed that the hypo-expression of APP695 observed in rat brain appears to be depend on the extent of vitamin A deficiency. In the paper Husson et al. (2003), we have hypothesized that after 10 weeks of depleted diet, vitamin A deficiency seems to be associated with adaptive processes, so-called allostatic state, suggesting that many physiological functions are mobilized and become stabilized at new levels far from homeostatic equilibrium. This process of apparent stability can return from homeostatic state or can lead to breakdown and illness with a continuing lack (Sterling and Eyer, 1988). Thus, in our opinion, after 13 weeks of deprived diet, the flexibility to maintain stability through allostatic state decreased leading to apparent signs of amyloid deposits characterized, in the present study, by a decreased amount of APP695 mRNA.

In order to continue with this investigation, a more precise study of the etiology of the amyloid deposit within a prolonged vitamin A deficiency (13 weeks) was performed. The expression of RAR $\beta$  and that of RA related genes encoding for proteins which are markers of this process were examined simultaneously, in brain subfields, i.e., striatum, hippocampus, and cortex. The APP, the  $\beta$ -site APP-cleaving enzyme (BACE) that cleaves the APP695, and its products, the APP C-terminal fragments (APP- $\beta$ CTF and APP- $\beta'$ CTF) were studied. These precursors of the peptide A $\beta$  are now considered to be potential early markers for the biological diagnosis of AD (Sergeant et al., 2002). The striatum was chosen because many authors have suggested a predominant role of retinoids in gene regulatory events in this subfield in adults, due to a specific expression pattern of retinoid-binding protein and aldehyde dehydrogenase as well as a high concentration of RA in this region (McCaffery and Dräger, 1994; Krezel et al., 1999; Zetterström et al., 1999; Wagner et al., 2002). The hippocampus and the cortex are two regions of the brain that exhibit a high degree of vulnerability to neuro-degeneration and which develop amyloid plaques in AD (Edelberg and Wei, 1996; Vickers et al., 2000; Irizarry et al., 2001; Duyckaerts, 2004).

After 13 weeks of vitamin A-free diet, the decrease in the RAR $\beta$  mRNA level observed in the striatum of rats was consistent with previous work obtained in rats fed a vitamin A deprived diet for 10 weeks (Husson et al., 2004). In addition, in the present study, a lower amount of RAR $\beta$  mRNA was observed in the cortex of VAD rats, which was not observed after 10 weeks of deprived diet. Thus, interestingly, the expression of vitamin A nuclear receptors was altered at first in the striatum, a region highly sensitive to vitamin A bioavailability, and somewhat later in the cortex. As observed in the whole brain, the decreased expression of RAR $\beta$  mRNA level was accompanied by hypo-expression of APP695. This hypo-expression was specific to the cortex in this model. The region-specific alteration of the expression of APP695 was consistent with data reported by several authors showing that, in spite of the vulnerability of the hippocampus associated with AD (Mishizen-Eberz et al., 2004), amyloid process but also AD essentially first affects the integrity of cortical circuitry (Vickers et al., 2000; Thal and Braak, 2005). Indeed, these last authors described five phases in human brain A $\beta$  deposits evolution. The first stage of A $\beta$  deposition begins in the exclusively neocortex before it expands to further areas and regions. The hierarchical pattern reflects the clinical gravity of the disease. Moreover, the lower level of APP695 mRNA in the cortex was in accordance with an increase in the ratio APP770-751/APP695. Indeed Johnson et al. (1989) suggested that an increased ratio of APP-751/APP695 is an important clue to the etiology of amyloid deposition and also of plaque formation in AD.

Like RAR $\beta$  and APP695, the BACE mRNA content decreased in the cortex of VAD rats compared to the controls. These results are coherent with Satoh and Kuroda (2000), who observed a positive regulation of BACE by RA in vitro. Moreover, Irizarry et al. (2001) have shown colocalization of APP, BACE, and amyloid deposit, especially in the cortex. The decreased level of BACE mRNA is surprising in that a lot of data have shown an increased activity and protein level of BACE in the brain of AD patients (Holsinger et al., 2002; Zohar et al., 2003; Fukumoto et al., 2004). Nevertheless, Benjannet et al. (2001) have suggested that the activity rate of BACE is related to numerous posttranslational modifications. Furthermore, other authors report any change in mRNA level of BACE in the brain of AD patients who suffer a

high load of A $\beta$  plaque formation (Gatta et al., 2002; Zohar et al., 2005). Concerning the amount of APP- $\beta$ CTF, the results showed no change in protein content in the hippocampus or in the striatum. This protein level was not quantifiable in the cortex. However, the 13-week vitamin-A-deficient rats exhibited a cortex specific decrease in the APP-CTF phosphorylated forms, i.e., APP- $\beta$ CTF<sup>P</sup>, APP- $\beta'$ CTF<sup>P</sup>, and concomitantly of APP- $\alpha$ CTF. This observation is consistent with the decreased expression of APP695, BACE, and RAR $\beta$  in the same brain area. The phosphorylated forms of APP- $\beta$ CTF and APP- $\beta'$ CTF seem to play a determining role in CTF processing leading to neuritic plaques formation, by facilitating their own cleavage into A $\beta$  by the  $\gamma$ -secretase (Vingtdeux et al., 2005).

In this way, the reduced levels of phosphorylated  $\beta$ - and  $\beta'$ CTF, which occurred in the cortex when vitamin A deficiency was extended, might be due to a rise in  $\gamma$ -secretase activity and so might reveal an increased in A $\beta$  formation. Indeed, some reports revealed an inverse relationship between  $\gamma$ -secretase and  $\alpha$ - and  $\beta$ CTF: (i) an elevation in the steady-state levels of  $\alpha$ - and  $\beta$ CTF in PS-1 gene knockout mice (a member of the  $\gamma$ -secretase complex) (Sinha, 2002) and (ii) an accumulation of the  $\gamma$ -secretase product ( $\gamma$ CTF) and a concomitant reduction in levels of both  $\alpha$ - and  $\beta$ CTF in different cell lines that over express PS-1 (Kim et al., 2003). Moreover, the decreased amount of protein of the constitutively fragment  $\alpha$ CTF (the  $\alpha$ -secretase product, generated during the physiological pathway), noted in the cortex of vitamin-A-deficient rats, might reflect an underlying neuropathic process, whereby APP695 is converted to  $\beta$ CTF and so A $\beta$  rather than to  $\alpha$ CTF. Indeed, such a process has been described in AD patients (Edelberg and Wei, 1996). This hypothesis was supported by recent reports suggesting an RA-associated shift of APP processing towards the alpha secretase pathway (Holback et al., 2005; Prinzen et al., 2005).

Together, these data demonstrated that hypo-activity of the retinoid signaling pathway leads to decreased expression of APP695, BACE, and APP-CTF in whole brain and cortex of rats fed a vitamin A-free diet for 13 weeks. These results are coherent with those of Corcoran et al. (2004), showing that a loss in RA function can lead to a  $\beta$  amyloid deposition in the adult rat.

#### *Effect of RA administration on the expression of RA nuclear receptor and target genes in the brain of vitamin A deprived rats for 10 or 13 weeks*

As shown previously, administration of RA to vitamin-A-deficient rats induces an up-regulation of its own nuclear receptors and this occurs whatever the duration (10 or 13 weeks) of the deficiency (Husson et al., 2003, 2004). Except the RAR $\beta$  expression about which the recovery effect of RA was exerted in the striatum and the cortex, other effects of RA administration to vitamin-A-deficient animals were only observed in the cortex. The in vivo effect of RA administration on the expression of APP695 constituted original results in that a similar up-regulation has been only observed in studies using in vitro models (Konig et al., 1990; Hung et al., 1992; Yang et al., 1998; Murray and Ihwe, 2003). This phenomenon occurred in whole brain and in the cortex of 13 week vitamin-A-deficient rats, areas that also exhibited altered APP695 expression. Surprisingly, if vitamin A deficiency remained without effect on the abundance of APP770 mRNA, RA treatment of vitamin-A-deficient animals induced an increase in it in the whole brain. The up-regulation of this APP isoform by RA has been

shown in vitro (Yoshikawa et al., 1990). As previously observed in vitro, administration of RA reversed hypo-expression of BACE (Sato and Kuroda, 2000). In the same way, the reduced amounts of the APP-CTF studied were normalized by RA treatment in the cortex. Therefore, it was hypothesized that RA administration restores the equilibrium between the constitutive and the amyloidogenic pathways. The normalization effect of RA on the APP770–751/APP695 ratio agrees with this hypothesis.

All these results, showing a recovery effect in amyloid deposits indicators by treatment of vitamin A deficiency with RA, lead to the conclusion that a collapse in retinoid signaling is, at least in part, involved in the amyloid deposit process and that, to a certain extent, RA treatment is able to reverse such a process.

#### Conclusion

The present data reveal a vitamin A deficiency-related dysregulation of the amyloidogenic pathway in the cortex of rats, which is known to be the first brain area altered by AD development. In this region, the decrease of APP695 and BACE mRNA and APP-CTF protein levels observed was restored by RA administration. These results complement earlier data revealing the involvement of retinoid signaling in the etiology of Alzheimer diseases (Goodman and Pardee, 2003; Corcoran et al., 2004) and argue for the potent anti-amyloidogenic effect of vitamin A suggested, to date, by in vitro studies (Ono et al., 2004). It has been hypothesized that vitamin A may protect neurons against oxidative stress, which may result from excessive production of A $\beta$  (Grundman and Delaney, 2002). Our present study, using animal model, suggests that vitamin A may prevent the development of AD not only by scavenging reactive oxygen species, but also by directly inhibiting the deposition of A $\beta$  in the brain via the regulation of target gene involved in amyloidogenic pathway. Moreover, the present results are coherent with studies showing that AD patients display low vitamin A serum concentrations (Bourdel-Marchasson et al., 2001; Rinaldi et al., 2003).

Together, these data argue for an important role of vitamin A via its nuclear receptors in the multiple processes involved in regulating plaque formation and so could be considered as a key molecule for development of therapies for AD. Attenuating A $\beta$  mediated neuro-degeneration is today of major consideration as a potential treatment of AD.

#### Acknowledgments

This research was supported by the Conseil Régional d'Aquitaine. The authors wish to thank M. Kurowska for technical assistance and L. Caune for animal care.

#### References

- Alfös, S., Boucheron, C., Pallet, V., Higuere, D., Enderlin, V., Beracochea, D., Jaffard, R., Higuere, P., 2001. A retinoic acid receptor antagonist suppresses brain retinoic acid receptor overexpression and reverses a working memory deficit induced by chronic ethanol consumption in mice. *Alcohol: Clin. Exp. Res.* 25 (10), 1154–1506.
- Beczowska, I.W., Buck, J., Inturrisi, C.E., 1996. Retinoic acid-induced increase in delta-opioid receptor and *N*-methyl-D-aspartate receptor

- mRNA levels in neuroblastoma × glioma (NG108-15) cells. *Brain Res. Bull.* 39, 193–199.
- Benjannet, S., Elagöz, A., Wickham, L., Mamarbachi, M., Murzer, J.S., Basak, A., Lazure, C., Cromlish, J.A., Sisioda, S., Checler, F., Chretien, M., Seidah, N.G., 2001. Post-translational processing of beta-secretase (beta-amyloid-converting enzyme) and its ectodomain shedding. The pro- and transmembrane/cytosolic domains affect its cellular activity and amyloid-beta production. *J. Biol. Chem.* 276, 10879–10887.
- Bodendorf, U., Danner, S., Fisher, F., Stefani, M., Sturchler-Pierrat, C., Wiederhold, K.H., Staufenbiel, M., Paganetti, P., 2002. Expression of human beta-secretase in the mouse brain increases the steady-state level of beta-amyloid. *J. Neurochem.* 80, 799–806.
- Bonet, M.L., Ribot, J., Felipe, F., Palou, A., 2003. Vitamin A and the regulation of fat reserves. *Cell. Mol. Life Sci.* 60, 1311–1321.
- Bourdel-Marchasson, I., Delmas-Beauvieux, M.C., Peuchant, E., Richard-Harston, S., Decamps, A., Reignier, B., Emeriau, J.P., Rainfray, M., 2001. Antioxidant defences and oxidative stress markers in erythrocytes and plasma from normally nourished elderly Alzheimer patients. *Age Ageing* 30, 235–241.
- Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for a quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Cai, H., Wang, Y., McCarthy, D., Wen, H., Borchelt, D.R., Price, D.L., Wong, P.C., 2001. BACE1 is the major beta-secretase for generation of Abeta peptides by neurons. *Nat. Neurosci.* 4, 233–234.
- Chiang, M.Y., Misner, D., Kempfermann, G., Slikorski, T., Giguere, V., Sucov, H.M., Gage, F.H., Stevens, C.F., Evans, R.M., 1998. An essential role for retinoid receptors RARbeta and RXRgamma in long-term potentiation and depression. *Neuron* 21, 1353–1361.
- Cocco, S., Diaz, G., Stancampiano, R., Diana, A., Carta, M., Curreli, R., Sarais, L., Fadda, F., 2002. Vitamin A deficiency produces spatial learning and memory impairment in rats. *Neuroscience* 115, 475–482.
- Corcoran, J.P., So, P.L., Maden, M., 2004. Disruption of the retinoid signalling pathway causes a deposition of amyloid beta in the adult rat brain. *Eur. J. Neurosci.* 20, 896–902.
- Dugué, M., Neugroschl, J., Sewell, M., Marin, D., 2003. Review of dementia. *Mount Sinai J. Med.* 70, 45–53.
- Duyckaerts, C., 2004. Looking for the link between plaques and tangles. *Neurobiol. Ageing* 25, 735–739.
- Edelberg, H.K., Wei, J.Y., 1996. The biology of Alzheimer's disease. *Mech. Ageing Dev.* 91, 95–114.
- Enderlin, V., Pallet, V., Alfos, S., Dargelos, E., Jaffard, R., Garcin, H., Higuere, P., 1997. Age-related decreases in mRNA for brain nuclear receptors and target genes are reversed by retinoic acid treatment. *Neurosci. Lett.* 229, 125–129.
- Etchamendy, N., Enderlin, V., Marighetto, A., Vouimba, R.M., Pallet, V., Jaffard, R., Higuere, P., 2001. Alleviation of a selective age-related relational memory deficit in mice by pharmacologically induced normalization of brain retinoid signaling. *J. Neurosci.* 21, 6423–6429.
- Etchamendy, N., Enderlin, V., Marighetto, A., Pallet, V., Higuere, P., Jaffard, R., 2003. Vitamin A deficiency and relational memory deficit in adult mice: relationships with changes in brain retinoid signalling. *Behav. Brain Res.* 145, 37–49.
- Evin, G., Zhu, A., Holsinger, R.M., Masters, C.L., Li, Q.X., 2003. Proteolytic processing of the Alzheimer's disease amyloid precursor protein in brain and platelets. *J. Neurosci. Res.* 74, 386–392.
- Farooqui, S.M., 1994. Induction of adenylate cyclase sensitive dopamine D2-receptors in retinoic acid induced differentiated human neuroblastoma SHSY-5Y cells. *Life Sci.* 55, 1887–1893.
- Feng, J., Song, S., Zheng, J., 2002. A new beta amyloid precursor protein cDNA found in Rat6 embryo fibroblasts. Unpublished, direct submission NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (GenBank accession no. AF513015).
- Fiorentini, C., Facchetti, M., Finardi, A., Sigala, S., Paez-Pereda, M., Sher, E., Spano, P., Missale, C., 2002. Nerve growth factor and retinoic acid interactions in the control of small cell lung cancer proliferation. *Eur. J. Endocrinol.* 147, 371–379.
- Fukumoto, H., Rosene, D.L., Moss, M.B., Raju, S., Hyman, B.T., Irizarry, M.C., 2004. Beta-secretase activity increases with aging in human, monkey, and mouse brain. *Am. J. Pathol.* 164, 719–725.
- Gao, Y., Pimplikar, S.W., 2001. The gamma-secretase-cleaved C-terminal fragment of amyloid precursor protein mediates signaling to the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 14979–14984.
- Gatta, L.B., Albertini, A., Ravid, R., Finazzi, D., 2002. Levels of beta-secretase BACE and alpha-secretase ADAM10 mRNAs in Alzheimer hippocampus. *NeuroReport* 13, 2031–2033.
- Goodman, A.B., Pardee, A.B., 2003. Evidence for defective retinoid transport and function in late onset Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 2901–2905.
- Grundman, M., Delaney, P., 2002. Antioxidant strategies for Alzheimer's disease. *Proc. Nutr. Soc.* 61 (2), 191–202.
- Holback, S., Aldlerz, L., Iverfeldt, K., 2005. Increased processing of APLP2 and APP with concomitant formation of APP intracellular domains in BDNF and retinoic acid-differentiated human neuroblastoma cells. *J. Neurochem.* 95 (4), 1059–1068.
- Holsinger, R.M., McLean, C.A., Beyreuther, K., Masters, C.L., Evin, G., 2002. Increased expression of the amyloid precursor beta-secretase in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 51, 783–786.
- Hung, A.Y., Koo, E.H., Haass, C., Selkoe, D.J., 1992. Increased expression of beta-amyloid precursor protein during neuronal differentiation is not accompanied by secretory cleavage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 9439–9443.
- Husson, M., Enderlin, V., Alfos, S., Féart, C., Higuere, P., Pallet, V., 2003. Triiodothyronine administration reverses vitamin A deficiency-related hypo-expression of retinoic acid and triiodothyronine nuclear receptors and of neurogranin in rat brain. *Br. J. Nutr.* 90, 191–198.
- Husson, M., Enderlin, V., Alfos, S., Boucheron, C., Pallet, V., Higuere, P., 2004. Expression of neurogranin and neuromodulin is affected in the striatum of vitamin A-deprived rats. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 123, 7–17.
- Iñiguez, M.A., Morte, B., Rodriguez-Pena, A., Munoz, A., Gerendasy, D., Sutcliffe, J.G., Bernal, J., 1994. Characterization of the promoter region and flanking sequences of the neuron-specific gene RC3 (neurogranin). *Brain Res. Mol. Brain Res.* 27, 205–214.
- Irizarry, M.C., Locascio, J.J., Hyman, B.T., 2001. Beta-site APP cleaving enzyme mRNA expression in APP transgenic mice: anatomical overlap with transgene expression and static levels with aging. *Am. J. Pathol.* 158, 173–177.
- Johnson, S.A., Pasinetti, G.M., May, P.C., Pontc, P.A., Cordell, B., Finch, C.E., 1988. Selective reduction of mRNA for the beta-amyloid precursor protein that lacks a Kunitz-type protease inhibitor motif in cortex from Alzheimer brains. *Exp. Neurol.* 102, 264–268.
- Johnson, S.A., Rogers, J., Finch, C.E., 1989. APP-695 transcript prevalence is selectively reduced during Alzheimer's disease in cortex and hippocampus but not in cerebellum. *Neurobiol. Ageing* 10, 755–760.
- Kato, S., Mano, H., Kumazawa, T., Yoshizawa, Y., Kojima, R., Masushige, S., 1992. Effect of retinoid status on alpha, beta and gamma retinoic acid receptor mRNA levels in various rat tissues. *Biochem. J.* 15 (286), 755–760.
- Kim, S.H., Ikeuchi, T., Yu, C., Sisodia, S.S., 2003. Regulated hyperaccumulation of presenilin-1 and the "gamma-secretase" complex. Evidence for differential intramembranous processing of transmembrane substrates. *J. Biol. Chem.* 278, 33992–34002.
- Kitazume, S., Tachida, Y., Oka, R., Kotani, N., Ogawa, K., Suzuki, M., Dohmae, N., Takio, K., Saido, T.C., Hashimoto, Y., 2003. Characterization of alpha 2,6-sialyltransferase cleavage by Alzheimer's beta-secretase (BACE 1). *J. Biol. Chem.* 278, 14865–14871.
- Kobayashi, M., Matsuoka, I., Kurihara, K., 1994. Cholinergic differentiation of cultured sympathetic neurons induced by retinoic acid. Induction of choline acetyltransferase-mRNA and suppression of tyrosine hydroxylase-mRNA levels. *FEBS Lett.* 337, 259–264.

- Konig, G., Masters, C.L., Beyreuther, K., 1990. Retinoic acid induced differentiated neuroblastoma cells show increased expression of the beta A4 amyloid gene of Alzheimer's disease and an altered splicing pattern. *F.E.B.S. Letter* 269, 305–310.
- Krezel, W., Kastner, P., Chambon, P., 1999. Differential expression of retinoid receptors in the adult mouse central nervous system. *Neuroscience* 89, 1291–1300.
- Lane, M.A., Bailey, S.J., 2005. Role of retinoid signalling in the adult brain. *Prog. Neurobiol.* 75, 275–293.
- Leblanc, A.C., Xue, R., Gambetti, P., 1996. Amyloid precursor protein metabolism in primary cell cultures of neurons, astrocytes, and microglia. *J. Neurochem.* 66, 2300–2310.
- Malik, M.A., Blusztajn, J.K., Greenwood, C.E., 2000. Nutrients as trophic factors in neurons and the central nervous system: role of retinoic acid. *J. Nutr. Biochem.* 11, 2–13.
- Maret, S., Franken, P., Dauvilliers, Y., Ghyselinck, N.B., Chambon, P., Tafti, M., 2005. Retinoic acid signaling affects cortical synchrony during sleep. *Sciences* 310 (5745), 111–113.
- Marill, J., Idres, N., Capron, C.C., Nguyen, E., Chabot, G.G., 2003. Retinoic acid metabolism and mechanism of action: a review. *Curr. Drug Metab.* 4, 1–10.
- McCaffery, P., Dräger, U.C., 1994. High levels of a retinoic acid-generating dehydrogenase in the meso-telencephalic dopamine system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 7772–7776.
- Mishizen-Eberz, A.J., Rissman, R.A., Carter, T.L., Ikonovic, M.D., Wolfe, B.B., Armstrong, D.M., 2004. Biochemical and molecular studies of NMDA receptor subunits NR1/2A/2B in hippocampal subregions throughout progression of Alzheimer's disease pathology. *Neurobiol. Dis.* 15, 80–92.
- Misner, D.L., Jacobs, S., Shimizu, Y., de Urquiza, A.M., Solomin, L., Perlmann, T., De Luca, L.M., Stevens, C.F., Evans, R.M., 2001. Vitamin A deprivation results in reversible loss of hippocampal long-term synaptic plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 11714–11719.
- Murray, J.N., Ihwe, O.J., 2003. Regulation of beta-amyloid precursor protein and inositol 1,4,5-trisphosphate receptor gene expression during differentiation of a human neuronal cell line. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 27, 351–363.
- Neve, R.L., Dawes, L.R., Yankner, B.A., Benowitz, L.I., Rodriguez, W., Higgins, G.A., 1990. Genetics and biology of the Alzheimer amyloid precursor. *Prog. Brain Res.* 86, 257–267.
- Ono, K., Yoshiike, Y., Takashima, A., Hasegawa, K., Naiki, H., Yamada, M., 2004. Vitamin A exhibits potent anti-amyloidogenic and fibril-destabilizing effects in vitro. *Exp. Neurol.* 189, 380–392.
- Prinzen, C., Muller, U., Endres, K., Kahrenholz, F., Postina, R., 2005. Genomic structure and functional characterization of human ADAM10 promoter. *FASEB J.* 19 (11), 1522–1524.
- Redonnet, A., Bonilla, S., Noël-Suberville, C., Pallet, V., Dabadie, H., Gin, H., Higuieret, P., 2002. Relationship between peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoic acid receptor alpha gene expression in obese human adipose tissue. *Int. J. Obes.* 26, 920–927.
- Rinaldi, P., Polidori, M.C., Metastasio, A., Mariani, E., Mattioli, P., Cherubini, A., Catani, M., Cecchetti, R., Senin, U., Mecocci, P., 2003. Plasma antioxidants are similarly depleted in mild cognitive impairment and in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 24, 915–919.
- Sahin, M., Karausum, S.B., Perry, G., Smith, M.A., Aliciguzel, Y., 2005. Retinoic acid isomers protect hippocampal neurons from amyloid-beta induced neurodegeneration. *Neurotox. Res.* 7, 243–250.
- Satoh, J., Kuroda, Y., 2000. Amyloid precursor protein beta-secretase (BACE) mRNA expression in human neural cell lines following induction of neuronal differentiation and exposure to cytokines and growth factors. *Neuropathology* 20, 289–296.
- Satoh, J., Kuroda, Y., 2001. Alpha-synuclein expression is up-regulated in Ntera2 cells during neuronal differentiation but unaffected by exposure to cytokines and neurotrophic factors. *Parkinsonism Relat. Disord.* 8, 7–17.
- Sergeant, N., David, J.P., Champain, D., Ghestem, A., Watzet, A., Delacourte, A., 2002. Progressive decrease of amyloid precursor protein carboxy terminal fragments (APP-CTFs), associated with tau pathology stages, in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 81, 663–672.
- Shivers, B., D., Hilbich, C., Multhaup, G., Salbaum, M., Beyreuther, K., Seeburg, P.H., 1988. Alzheimer's disease amyloidogenic glycoprotein: expression pattern in rat brain suggests a role in cell contact. *EMBO J.* 7, 1365–1370.
- Simons, M., de Strooper, B., Multhaup, G., Tienari, P.J., Dotti, C.G., Beyreuther, K., 1996. Amyloidogenic processing of the human amyloid precursor protein in primary cultures of rat hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 16, 899–908.
- Sinha, S., 2002. The role of beta-amyloid in Alzheimer's disease. *Med. Clin. North Am.* 86, 629–639.
- Sterling, P., Eyer, J., 1988. Allostasis: a new paradigm to explain arousal pathology. In: Fisher, S., Reason, J. (Eds.), *Handbook of Life Stress, Cognition and Health*. John Wiley, Chichester, pp. 629–649.
- Tanzi, R.E., McClatchey, A.I., Lamperti, E.D., Villa-Komaroff, L., Gusella, J.F., Neve, R.L., 1988. Protease inhibitor domain encoded by an amyloid protein precursor mRNA associated with Alzheimer's disease. *Nature* 331, 528–530.
- Thal, D.R., Braak, H., 2005. Post-mortem diagnosis of Alzheimer's disease. *Pathologie* 26, 201–213.
- Vickers, J.C., Dickson, T.C., Adlard, P.A., Saunders, H.L., King, C.E., McCormack, G., 2000. The cause of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Prog. Neurobiol.* 60, 139–165.
- Vingdeux, V., Hamdane, M., Gompel, M., Bégard, S., Drobecq, H., Ghestem, A., Grosjean, M.E., Kostanjevecki, V., Grognet, P., Vanmechelen, E., Buée, L., Delacourte, A., Sergeant, N., 2005. Phosphorylation of amyloid precursor carboxy-terminal fragments enhances their processing by a gamma-secretase-dependent mechanism. *Neurobiol. Dis.* 20 (2), 625–637.
- Wagner, E., Luo, T., Dräger, U.C., 2002. Retinoic acid synthesis in the postnatal mouse brain marks distinct developmental stages and functional systems. *Cereb. Cortex* 12, 1244–1253.
- Yamagata, T., Momoi, T., Kumagai, H., Nishikawa, T., Yanagisawa, M., Momoi, M., 1993. Distribution of retinoic acid nuclear receptor  $\beta$  in rat brain: up-regulation by retinoic acid. *Biomed. Res.* 14, 183–190.
- Yang, Y., Ouitschke, W.W., Brewer, G.J., 1998. Upregulation of amyloid precursor protein gene promoter in rat primary hippocampal neurons by phorbol ester, IL-1 and retinoic acid, but not by reactive oxygen species. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 60, 40–49.
- Yoshikawa, K., Aizawa, T., Maruyama, K., 1990. Neural differentiation increases expression of Alzheimer amyloid protein precursor gene in murine embryonal carcinoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 171, 204–209.
- Zetterström, R.H., Lindqvist, E., Mata de Urquiza, A., Tomac, A., Eriksson, U., Perlmann, T., Olson, L., 1999. Role of retinoids in the CNS: differential expression of retinoid binding proteins and receptors and evidence for presence of retinoic acid. *Eur. J. Neurosci.* 11, 407–416.
- Zohar, O., Cavallaro, S., D'Agata, V., Alkon, D.L., 2003. Quantification and distribution of beta-secretase alternative splice variants in the rat and human brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 115, 63–68.
- Zohar, O., Pick, C.G., Chapman, J., Katzav, A., Milman, A., Alkon, D.L., 2005. Age-dependent differential expression of BACE splice variants in brain regions of tg2576 mice. *Neurobiol. Aging* 26, 1167–1175.

### 3. Effet d'une carence vitaminique A de 14 semaines sur l'expression de certains marqueurs du processus amyloïdogène et sur le taux de peptides A $\beta$

Ce travail avait pour objectif d'étudier l'effet d'une carence prolongée en vitamine A (14 semaines) suivie ou non d'un traitement par l'AR sur l'expression et le taux protéique de BACE, ADAM10, PS1, IDE et ApoD, sur les activités  $\alpha$ -,  $\beta$ - et  $\gamma$  sécrétases et sur le taux de peptides A $\beta$ -40 et A $\beta$ -42 dans l'hippocampe et le cortex de rats. *Ce travail fait l'objet de la publication N°4 en préparation.*

#### 3.1. Méthodologie utilisée :

Des rats au sevrage ont été divisés en 2 lots, témoins et carencés, selon le régime alimentaire qui leur était fourni. Après 14 semaines de régime dépourvu en vitamine A, une partie des rats carencés a reçu, par injection sous-cutanée, 150 $\mu$ g d'AR/kg d'AR quotidiennement pendant 6 jours.

L'expression de BACE, ADAM10, PS1, IDE et ApoD a été mesurée par RT-PCR en temps réel, leur taux protéique a été quantifié par western-blot. Les activités enzymatiques ont été mesurées par fluorescence, et les taux de peptides A $\beta$ -40 et -42 par Elisa.

#### 3.2. Principaux résultats et discussion

Les principaux résultats mettent en évidence une augmentation de l'expression de BACE (ARNm et protéines), de PS1 et de l'activité enzymatique de la  $\gamma$ -sécrétase (non significative mais qui avoisine les 20%) dans le cortex des animaux carencés en vitamine A. Concernant ApoD et IDE, la carence n'a pas induit de modification de leurs taux d'ARNm et protéiques. Les modifications observées ne conduisent pas à une augmentation du taux de peptides A $\beta$ . Aucune modification importante de la voie physiologique n'a été observée.

Nos résultats nous confortent dans l'idée qu'une carence vitaminique A prolongée semble favoriser la dégradation de l'APP695 selon la voie amyloïdogénique. Comme dans l'étude précédente, les modifications observées apparaissent essentiellement dans le cortex, première structure touchée dans la MA. L'augmentation significative du taux d'ARNm de BACE observée chez les animaux carencés est en accord avec les résultats obtenus par (*Li et al. 2004*) dans le cortex de patients Alzheimer. Nous pouvons ainsi proposer que l'augmentation de la durée du régime dépourvu en vitamine A change les modalités de la régulation physiologique de l'expression du gène cible BACE (observée dans l'étude présentée précédemment) induisant ainsi la mise en place d'un processus pathologique. Cette surexpression génique de BACE chez des rats carencés ne s'accompagne pas de modification significative du taux protéique de BACE ni de l'activité enzymatique. Ces résultats peuvent être rapprochés de ceux de (*Borghini et al. 2006*) obtenus chez des patients qui ne sont pas considérés comme atteints de MA mais qui développent des plaques amyloïdes de manière abondante. Concernant PS1, une augmentation significative de son taux d'ARNm et de protéines a été observée dans le cortex des rats carencés en vitamine A ; cette modification s'accompagne d'une augmentation de l'activité enzymatique non significative mais proche de 20%. Nos résultats révèlent une modification de la régulation de l'expression génique de PS1 par l'AR mise en évidence *in vitro* par (*Flood et al. 2004*) et laisse supposer un basculement du processus biochimique de dégradation de la protéine APP en faveur de la voie amyloïdogénique dans le cortex, et par conséquent en faveur de la formation du peptide

A $\beta$ . Des données bibliographiques ont effectivement montré (i) une corrélation positive entre l'augmentation de l'activité enzymatique de la  $\gamma$ -sécrétase et l'augmentation du processus amyloïdogène et (ii) une inhibition de la  $\gamma$ -sécrétase induit une baisse de 40% de la formation de peptide A $\beta$  (Selkoe 2001). Nos résultats n'ont cependant pas permis d'observer des modifications du taux protéique du peptide A $\beta$  dans le cortex et l'hippocampe des rats soumis pendant 14 semaines à un régime carencé en vitamine A.

L'administration d'AR semble normaliser les modifications induites par la carence. En effet, dans le cortex, structure présentant les modifications associées à la carence les plus importantes, la dégradation de la protéine APP selon la voie amyloïdogénique semble être atténuée par une administration d'AR. En revanche, dans l'hippocampe, le traitement par l'AR des rats carencés en vitamine A entraîne une augmentation significative du taux protéique de BACE (+20%), et de l'activité de l'enzyme  $\beta$ -sécrétase (+33%), et du taux des peptides A $\beta$ -40 et 42. Les travaux de (Li et al. 2006) suggèrent que l'augmentation du taux de transcription de BACE et de l'activité de l'enzyme  $\beta$ -sécrétase serait un élément clé du processus amyloïdogène et reflèterait directement une augmentation du peptide A $\beta$  qui est à l'origine de la formation des plaques amyloïde. Cette augmentation a effectivement été observée, de manière plus prononcée dans l'hippocampe, chez les rats carencés traités par l'AR sans toutefois augmenter le rapport A $\beta$ 42/A $\beta$ 40, indicateur de la MA.

*Les résultats obtenus dans cette nouvelle étude nous confortent dans l'idée d'une implication de la voie de signalisation de la vitamine A dans le contrôle des processus impliqués dans l'apparition des dépôts amyloïdes. La régulation par l'AR de l'expression des protéines impliquées dans les processus de dégradation de l'APP a essentiellement été mise en évidence in vitro. Ce travail est la première étude qui considère cette régulation dans un contexte physiologique, chez l'animal entier. Il montre que les modalités de régulation de ces protéines par l'AR sont modifiées avec la durée de carence induisant progressivement un déséquilibre entre la voie constitutive et la voie amyloïdogénique. Cette dernière devient privilégiée mais ne conduit pas, dans le délai de l'étude, à une modification du taux de peptides A $\beta$ .*

*Concernant ce modèle de carence, nous savons qu'il s'accompagne de modifications déterminantes du statut thyroïdien qui devient limitant dans la régulation par l'AR de ses gènes cibles. C'est pourquoi dans la suite de ce travail, nous avons étudié un autre type de perturbation hormonale caractéristique du vieillissement : le statut thyroïdien. Les relations entre le statut vitaminique A et le statut thyroïdien sont largement décrites dans la littérature et nous savons en particulier que les animaux hypothyroïdiens présentent une altération simultanée des voies de signalisation de l'AR et de la T3 (métabolite actif des hormones thyroïdiennes).*

# Publication 3

## Vitamin A hyposignalling modulates APP degrading processing.

Ghenimi Rahab N., Troquier L., Redonnet A., Beauvieux MC., Gallis JL., Higuieret P., Pallet V., Enderlin V.

En préparation pour *Neurobiology of aging*

Alzheimer's disease is characterized by extracellular neuritic plaques composed of fibrillar  $\beta$ -amyloid ( $A\beta$ ) peptide and intracellular neurofibrillary tangles containing hyperphosphorylated tau. Clinical evidence has shown defective retinoid transport and function in AD brain, suggesting that decreasing the availability of RA in the brain may increase  $A\beta$ -associated neurodegeneration. Retinoic acid (RA), the active metabolite of vitamin A (retinoids), has been shown to control, through its nuclear receptors: the RA receptors (RARs) and retinoid X receptors (RXRs), the expression of genes related to APP processing. Deprivation of vitamin A results in  $A\beta$  accumulation. In amyloid precursor protein (APP) and presenilin 1 (PS1) double-transgenic mice, the administration of RA prevents  $A\beta$  plaque accumulation, prevents APP processing. We then evaluated, in hippocampus and cortex of rats, the effect of vitamin A deficiency (VAD), with or without subsequent administration of RA, on the expression (mRNA, proteins) of retinoid target genes involved in physiologic and amyloidogenic pathways of the APP processing (APP, ADAM 10, BACE, PS1, APOD and IDE). The activity of secretases and  $A\beta$  peptides has been also quantified. Our study evidenced that hypoactivity of retinoid signalling change the equilibrium between non amyloidogenic and amyloidogenic pathways of the APP processing particularly in the cerebral cortex of rats fed a vitamin A-free diet for 14 weeks. Administration of RA to these vitamin A deprived rats (i) on one hand reduced the RA hyposignalling related amyloidogenic pathway modifications observed in the cortex, (ii) on the other hand increased some indicators of amyloidogenic pathway of APP processing leading to an increased of  $A\beta$  peptides in the hippocampus. The present data reveal a vitamin A deficiency-related dysregulation of the amyloid pathway in the cortex of rats, which is known to be the first brain area altered by AD development.



## 1. Introduction

AD is the most common cause of dementia in the elderly, characterized by the progressive deterioration of cognitive functions. Clinical symptoms include alterations in neural plasticity (e.g. the loss of selective neurons and synapses), extracellular senile plaques containing amyloid- $\beta$  peptides ( $A\beta$ -40 and  $A\beta$ -42) deposits, as well as intraneuronal neurofibrillary tangles (*Selkoe 2001*).  $A\beta$  peptides are generated by two sequential endoproteolytic cleavages of the  $\beta$ -amyloid precursor protein (APP) catalyzed initially by the  $\beta$ -site APP-cleaving enzyme 1 (BACE1) and subsequently by  $\gamma$ -secretase (*Shoji et al. 1992; Saito et al. 1996; Vassar 2004*). Aggregated  $A\beta$  peptides resulting from this amyloidogenic pathway of the APP processing seem having a central role in AD pathology. In physiological conditions a secretory pathway of APP includes the cleavage of APP by a putative  $\alpha$ -secretase in the  $A\beta$  region, thereby precluding the formation of  $A\beta$ . This type of  $\alpha$ -secretase activity has been attributed to the metalloproteinases ADAM9 and ADAM10 (*Selkoe 2002*).

Some data reveal that retinoid hyposignalling, presumably resulting from decreased bioavailability of retinoid ligands naturally, was shown to result in aging-related synaptic plasticity and long term potentiation (LTP) alterations as well as in aging-related decline of cognitive function (*Enderlin et al. 1997; Etchamendy et al. 2001; Feart et al. 2005; Mingaud et al. 2008*). Response to vitamin A is performed by its active metabolite, the retinoic acid (RA) which mediates its effect by inducing or repressing transcription of genes through binding to specific nuclear receptors which are transcription factors: RAR (whose ligands are the *all-trans* RA and *9-cis* RA isomers) and RXR (whose ligand is the *9-cis* RA isomer) (*Marill et al. 2003*). Genetic, metabolic and dietary evidence has been provided for a defective retinoid metabolism in AD: serum level of the vitamin A is decreased in AD patients (*Zaman et al. 1992; Jimenez-Jimenez et al. 1999*). The activity of retinaldehyde dehydrogenase (RALDH), enzyme that generate RA, is increased in AD brain (*Connor and Sidell 1997*). Genetic linkages can be found to AD for markers close to chromosomal loci coding for genes retinoid cellular or nuclear receptors as well as for vitamin A metabolic enzyme (*Goodman and Pardee 2003*). Finally, key steps of the amyloid production process are under the control of proteins whose expression is positively regulated by RA *in vitro*, including: APP, the  $\beta$ -site APP cleaving enzyme (BACE or  $\beta$ -secretase), presenilin 1 and 2 (PS1 and PS2), two of the complex  $\gamma$ -secretase proteins (their up-regulation by ATRA might promote plaque formation), as well as ADAM10 (*Culvenor et al. 2000; Satoh and Kuroda 2000; Lane and Bailey 2005; Prinzen et al. 2005; Tippmann et al. 2009*). Interestingly, an *in vitro* study revealed that RA treatment increases the ADAM10 protein level much more than that of BACE, suggesting a shift in APP processing

toward the  $\alpha$ -secretase pathway in response to RA (Holback *et al.* 2005; Holback *et al.* 2008). The insulin degrading enzyme (IDE), a metalloprotease enzyme responsible for insulin degradation, has been shown to play a key role in A $\beta$  peptide degradation both *in vitro* and *in vivo*, and is selective for the A $\beta$  monomer. Its activity, protein and mRNA levels are decreased in AD brain tissue and are associated with increased A $\beta$  levels (Perez *et al.* 2000; Miller *et al.* 2003; Zhao *et al.* 2004; Miners *et al.* 2008), suggesting that the modulation of IDE activity may alter the risk for AD. IDE contains a RARE response element in its promoter and the transcription of IDE is positively regulated by RA (Melino *et al.* 1996).

Clinical evidence has shown defective retinoid transport and function in AD brain (Goodman and Pardee 2003), suggesting that decreasing the availability of RA in the brain may increase A $\beta$ -associated neurodegeneration (Goodman 2006; Maden 2007). It had been shown that the disruption of retinoid signaling causes the deposition of  $\beta$ -amyloid in the adult brain (Corcoran *et al.* 2004). Similarly, vitamin A (or retinoid) inhibits and destabilizes preformed A $\beta$  aggregates and consequently protects against plaque formation, probably via its nuclear receptors (Ono *et al.* 2004; Sahin *et al.* 2005; Husson *et al.* 2006). (Husson *et al.* 2006) have revealed a vitamin A-deficiency-related dysregulation of the amyloidogenic pathway of the APP processing in the cortex of rats, characterized by (i) an increase in the APP770-751/APP695 ratio, which is an important clue to the etiology of amyloid deposition and also of plaque formation in AD patients (Johnson *et al.* 1990; Preece *et al.* 2004), and (ii) a reduced levels of phosphorylated APP- $\beta$  and - $\beta$ 'CTF which might be due to a rise in  $\gamma$ -secretase activity and thus, might reveal an increase in A $\beta$  formation (Vingtdeux *et al.* 2005). Administration of RA to these vitamin A deprived rats restored all the modifications observed. Finally, very recently, several authors have reported results supporting all-trans-retinoic acid (ATRA) as an effective therapeutic agent for the prevention and treatment of AD. In amyloid precursor protein (APP) and presenilin 1 (PS1) double-transgenic mice, the administration of ATRA induced a robust decrease in brain A $\beta$  deposition and tau phosphorylation (Ding *et al.* 2008).

Together, these data indicating the involvement of retinoid signalling in the processes involved in the elderly as well as in the Alzheimer's disease argue for the potent anti-amyloidogenic effect of vitamin A. Nevertheless, the underlying molecular mechanisms are incompletely understood. We hypothesized that hypoactivity of retinoid pathway which take place during aging, by inducing modifications of the expression of its target genes could change the equilibrium between non amyloidogenic and amyloidogenic pathways of the APP processing, leading to the accumulation of the A $\beta$  peptide. In the present study, in order

to precise the involvement of vitamin A signalling pathway on A $\beta$  deposition, we investigated the expression and protein level of RA target genes i.e. BACE, ADAM10, PS1, IDE and ApoD (apolipoprotein D) which may function to facilitate aggregation of A $\beta$  (Desai *et al.* 2005), the enzymatic activity of  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -secretase and finally the protein level of A $\beta$ -40 and A $\beta$ -42 in vitamin A depleted rats administrated or not by RA. Interestingly, this VAD model was responsible for alteration of the neuronal plasticity as well as for cognitive impairment similar of those observed during aging (Etchamendy *et al.* 2003; Husson *et al.* 2004; Bonnet *et al.* 2008). Investigations had been realized in the hippocampus and the cortex of animals, two regions of the brain that exhibit a high degree of vulnerability to neurodegeneration and which develop amyloid plaques in AD (Edelberg and Wei 1996; Vickers *et al.* 2000; Irizarry and Hyman 2001; Irizarry *et al.* 2001; Duyckaerts 2004).

## 2. Materials and methods

### Animals and treatments

Weaning male Wistar rats (3-week old) were purchased from Harlan (Gannat, France). They were housed two per cage in a room with a constant airflow system, controlled temperature (21–23°C), and a 12 h light/dark cycle. The rats were given *ad libitum* access to food and water and were randomly divided into two experimental groups. One group (n = 28) received a vitamin A-free diet (Laboratorio Piccionni, Italy), whereas the second group (n = 14) was fed with a control diet containing 5 IU retinol/g (INRA, Jouy en Josas). All experiments were performed in accordance with the European Communities Council Directives (86/609/EEC) and the French national Committee (87/848) recommendations.

**RA injections.** At the 13th week, half the VAD rats were injected daily with RA (150  $\mu$ g of *all-trans*-RA/kg, Sigma, France) during one week. RA was dissolved in a mixture (vehicle) containing polyethyleneglycol-NaCl-ethanol (70:20:10, by vol.). This dose of RA was shown to be effective in reversing age-related hypoexpression of brain signalling and its associated memory impairment (Etchamendy *et al.* 2001). Others animals groups (the other half of the VAD and controls) were treated daily with vehicle only the same time. Rats were sacrificed by decapitation, hippocampus and cortex were rapidly removed and stored at -80°C.

### Measurement of serum retinol concentration

Blood was collected and spun at 3000 rpm for 15 minutes. The supernatant was removed and snap frozen on dry ice. Serum retinol was assayed by HPLC according to a previously described method (Leclercq and Bourgeay-Causse, 1981).

### Real-Time PCR analysis

Expression of genes implicated in retinoid signalling and associated with Alzheimer disease was measured by RT-PCR. Extraction of RNA was conducted using an extraction kit (Trizol reagent, Invitrogen, France) according to the manufacturer's instructions. The quality and the concentration of RNA were determined by spectrophotometry using NanoDrop® ND-1000.

Then, the integrity of the purified RNA was verified using the RNA 6000 Pico LabChip kit in combination with the 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies). Using OligodT and random primers (Promega, France), cDNA was synthesized with ImPromII reverse transcriptase (Promega, France). Briefly, 1 µg of total RNA mixed with RNasin (Promega, France) and DNase (Roche, France) was incubated at 37°C. Then, OligodT plus random primers were added for incubation at 70°C. The reverse transcriptase reaction was performed at 42°C for 60 min in a final volume of 20 µl. The polymerase chain reaction (PCR) was performed in a LightCycler system (Roche Diagnostics, Germany). The forward and reverse primer sequences for each gene are in *Table 1*. To detect target genes amplification products, a LightCycler DNA Master SYBR Green I kit was used according to the manufacturer's instructions. PCR was performed in micro-capillary tubes in a final volume of 20 µl, containing 1× LC-DNA Master Green I mix, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 µM of each primer and 2.5 ng of cDNA. Quantification data were analysed as described by (Feart *et al.* 2005). The specificity and the identity of the amplified products was verified as follows: (1) melting curve analysis showed a single melting peak after amplification, and (2) amplified products for each gene were verified by sequencing with the Big Dye Terminator v1.1. (Applied Biosystems) and analyzed on a ABI 3130 sequencer (Applied Biosystems). The results were normalized by the ratio of the relative concentration of target to that of PPIB (cyclophilin B) in the same sample.

### Western blot analysis

Brain tissue of the different groups was homogenized in β secretase extraction buffer and whole homogenate was then centrifugated at 15000 rpm for 10 min at 4°C, supernatant was

removed and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until used. Quantification of total proteins was made using BCA kit measuring absorbance at 562 nm. The samples of each supernatant were heat-blocked for 5 min in a loading buffer (Tris-HCl 0.5M, 5% SDS, 25% glycerol, 5%  $\beta$ -mercaptoethanol, 0.02% bromophenol blue, pH 6.8). The same quantity of total brain proteins respectively 15 $\mu\text{g}$ /lane for cortex and 10 $\mu\text{g}$ /lane for hippocampus was then loaded on a 9% Tris-Glycine SDS-polyacrylamide gel and transferred to a nitrocellulose membrane at 3 mA/cm<sup>2</sup> per gel using the semidry Trans-blot SD Bio-Rad system (170-3940) (Bio-Rad Laboratories, Munich, Germany). Proteins were reversibly stained with Ponceau Red to check the quality of the transfer. The membranes were preblocked in PBS Tween1% non fat milk 5% (NaCl 0,145 M ; NAH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O 1,5mM ; NA<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> anhydre 8 mM) for 1 h30, incubated overnight at 4°C with primary antibody and incubated for 1 h at room temperature with secondary antibody. Primary antibodies used are: anti-BACE1 1:2000 (Calbiochem), anti-ADAM10 1:2000 (Calbiochem), anti-PS1 1:1000 (Affinity Bioreagents), anti-IDE 1:1000 (SantaCruz), anti-ApoD 1:1000 (SantaCruz), anti-actin 1:8000 (Sigma). Membranes were washed with PBS Tween 1% non fat milk 5% and proteins visualized using the enhanced chemiluminescence method ("Western lightning", Perkin Elmer). The staining intensity of protein bands was determined using Quantity One, quantification software (Bio-Rad Laboratories, USA). The relative levels in proteins in VAD rats treated with RA or not were determined as a percentage of the same proteins in control rats.

#### Activities of $\alpha$ - and $\beta$ -secretases

The total activities of  $\alpha$ -  $\beta$  and  $\gamma$ -secretases present in hippocampus and cortex were determined using commercially available secretase-Kits from R&D systems (Wiesbaden, Germany) according to the manufacture's protocol. The structures isolated from one hemisphere were homogenized in cold 1 X Cell Extraction Buffer (ready for use in the kit) to yield a final protein concentration between 0.5 to 2 mg/ml. The method is based on the secretase-dependent cleavage of a secretase-specific peptide conjugated to the fluorescent reporter molecules EDANS and DABCYL, which results into the release of a fluorescent signal that can be detected on a fluorescent microplate reader (excitation wavelength of 355 nm and emission at 510 nm). The level of secretase enzymatic activity is proportional to the fluorometric reaction, and here the data are expressed as a percentage of the same activities in control rats.

### ELISA A $\beta$

Tissue levels of A $\beta$  were measured using enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). For ELISA, the dissected brain tissues were homogenized in 800 $\mu$ l or 500 $\mu$ l, respectively for cortex and hippocampus of Tissue Protein Extraction Reagent (T-PER, Pierce) containing 1mM of AEBSF. The homogenates were centrifuged at 15000 rpm for 5 min to pellet cell/tissue debris. Supernatant was collected and total protein levels were measured using Bio-Rad Assay Kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Levels of A $\beta$ 1-40 and A $\beta$ 1-42 were measured using commercially available Human/Rat  $\beta$  amyloid (40) and (42) Elisa kit Wako (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) according to the manufacturer's instructions. Briefly, duplicate standards (A $\beta$ 1-40 or A $\beta$ 1-42) and tissue extracts were incubated overnight at 4°C in coated plates with anti-human A $\beta$ 11-18 monoclonal antibody (clone BNT77). After washing, all wells were incubated with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-A $\beta$ 1-40 monoclonal antibody (clone BA27) or anti-A $\beta$ 1-42 monoclonal antibody (clone BC05) for 60 min at 4 °C. After washing, wells reacted with TMB solution. Absorbance at 450 nm was determined using the Victor Multilabel plate reader (Perkin Elmer). Data are expressed as mg protein (cortex and hippocampus) as a percentage of the same proteins in control rats.

### Statistical analysis

The statistical significance of differences between means was calculated by analysis of variance (ANOVA). The *F*-value is determined in the ANOVA-table and should be above a critical *F*-value. When *F*-value indicated significance, means were compared using the Tuckey's post-hoc test for all data. *p* values < 0.05 were considered to be statistically significant.

## **3. Results**

### **3.1 Status of vitamin A deficiency**

Previous study showed that vitamin A-free diet consumption for 10 weeks correspond to the time course of vitamin A depletion in rat (Husson *et al.* 2003). Following this period, the serum retinol concentration as well as liver retinol concentration significantly decreased in vitamin A deprived rats compared to controls. Retinyl palmitate was almost undetectable in vitamin A deficient rat liver.

As described previously by (Bonnet *et al.* 2008) serum retinol concentration was drastically reduced in animals were fed a vitamin A free diet for 14 weeks ( $< 0.01 \mu\text{mol/l}$  in VAD rats versus  $1.46 \pm 0.08 \mu\text{mol/l}$  in control rats). Growth of VAD rats slowed down after 6 weeks ( $p=0.0007$ , VAD versus controls) and reached a plateau until 14 weeks (figure 1).

### 3.2 Effect of vitamin A deficiency

#### 3.2.1 on RA nuclear receptor

The level of RAR $\beta$  mRNA was 28% and 18% lower respectively in hippocampus ( $0.940 \pm 0.113$  versus  $1.302 \pm 0.096$ ,  $P=0.042$ ) and cortex ( $1.319 \pm 0.148$  in depleted rats versus  $1.607 \pm 0.089$ ,  $P= 0.12$  in control rats) of vitamin A deprived rats compared to control rats.

#### 3.2.2 on the expression and activity of ADAM10, a non amyloidogenic pathway indicator

No significant change of ADAM10 expression and enzymatic activity was observed in the hippocampus of vitamin A deprived rats compared to the controls (figure 2a). In the cerebral cortex, whereas mRNA level was significantly increased about 18 % ( $P=0.011$ ) in the vitamin A deprived rats compared to the control animals, no difference was observed for protein level and for  $\alpha$ -secretase activity (figure 2b).

#### 3.2.3 on the expression and activity of some amyloidogenic pathway indicators

Concerning BACE, the mRNA increased in the cortex and hippocampus (respectively +25%,  $P=0.014$  and +30%,  $p=0.0095$ ) of vitamin A deprived rats compared to the controls (figure 3). Regarding BACE protein level and  $\beta$ -secretase activity, no difference was observed in the vitamin A deprived rat hippocampus compared control rats (figure 3a). In the cerebral cortex a weak but significant decreased of  $\beta$ -activity (-9%) had been observed in the VAD rats compared to the controls (figure 3b).

Concerning PS1, a significant increased level of about 56% ( $P=0.015$ ) was observed in the hippocampus of VAD rats compared to control rats (figure 4a). In the cerebral cortex, VAD increased the mRNA (+21%,  $p=0.17$ ) and protein (+48%,  $P= 0.0031$ ) levels; in the same way  $\gamma$ -secretase activity was weakly but significantly increased about 9 % in vitamin A deprived rats compared to the control animals (figure 4b).

#### 3.2.4 on the level of A $\beta$ -40 and -42 peptides

The amount of A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42 peptides levels was unchanged in the cortex and in the hippocampus of vitamin A deprived rats compared to control animals (table 2).

### ***3.2.5 on the expression of IDE and ApoD***

No significant changes of ApoD and IDE expression was observed in hippocampus of vitamin A deprived rats as compared to the controls (tables 3 and 4). In the cerebral cortex, whereas the abundance of mRNA was unchanged, the protein level of IDE and ApoD was increased about 26% ( $p=0.10$ ) and 40% ( $p=0.023$ ) respectively in vitamin A deprived rats as compared to the controls.

## **3.3 Effect of RA administration**

### ***3.3.1 on RA nuclear receptor***

RA administration increased its own nuclear receptors mRNA levels of about 27% in the hippocampus ( $1.069 \pm 0.029$  in VAD rats treated by RA versus  $0.840 \pm 0.046$  in VAD rats,  $P=0.0013$ ) and 16% in the cortex ( $1.530 \pm 0.167$  in VAD rats treated by RA versus  $1.318 \pm 0.148$  in VAD rats,  $P=0.36$ ).

### ***3.3.2 on the expression and activity of ADAM10, a non amyloidogenic pathway indicator***

RA administration to VAD rats unchanged the expression and the activity of ADAM10 in the brain regions studied (figure 2).

### ***3.3.3 on the expression and activity of some amyloidogenic pathway indicators***

The abundance of BACE mRNA was unchanged by RA administration in the two areas studied. Concerning the BACE protein level and enzymatic activity, whereas a significant increased level was observed in the hippocampus (respectively +20%,  $p=0.025$  and +30%,  $p<0.001$ ), a significant decreased about 12% of protein level was observed in the cerebral cortex (figure 3). A significant increased amount of PS1 protein (+31%,  $p<0.001$ ) was observed in the hippocampus of vitamin A deprived rats administrated by RA as compared VAD rats (figure 4a). In the cerebral cortex, no significant changes were observed in VAD rats treated by RA even if RA treatment was able to reduce about 16% the increased protein level associated to VAD (figure 4b).

### ***3.3.4 on the level of A $\beta$ -40 and -42 peptides***

The amount of the A $\beta$ -40 peptide was significantly increased in the cortex (+20%,  $P=0.005$ ) and in the hippocampus (+45%,  $p<0.001$ ) of vitamin A deprived rats treated with RA as compared to VAD rats (table 2). Regarding the amount of A $\beta$ -42 peptide, whereas no change



was observed in the cortex, a significant increased of about 40% ( $P=0.002$ ) was observed in the hippocampus following RA administration in vitamin A deprived rats.

### 3.3.5 on the expression IDE and ApoD

After RA administration, only a significant increased of IDE mRNA abundance (+10%,  $P=0.015$ ) was observed in the hippocampus of vitamin A deprived rats (table 3). In the cortex, the administration of RA increased the protein level of ApoD about +53%, ( $p<0.001$ ) whereas no modification was observed concerning IDE mRNA and protein levels as compared to VAD rats (tables 3 and 4).

## 4. Discussion

### 4.1 Effect of vitamin A deficiency on APP processing in the brain of rats

Our study evidenced that hypoactivity of retinoid signalling change the equilibrium between non amyloidogenic and amyloidogenic pathways of the APP processing particularly in the cerebral cortex of rats fed a vitamin A-free diet for 14 weeks. Administration of RA to these vitamin A deprived rats (i) on one hand reduced the RA hyposignalling related amyloidogenic pathway modifications observed in the cortex, (ii) on the other hand increased some indicators of amyloidogenic pathway of APP processing leading to an increased of  $A\beta$  peptides in the hippocampus.

The region specific modifications observed in the present study were consistent with data reported by several authors showing that, in spite of the vulnerability of the hippocampus associated with AD (*Mishizen-Eberz et al. 2004*) amyloid process but also AD essentially first affects the integrity of cortical circuitry (*Vickers et al. 2000; Thal and Braak 2005*). *Husson et al. (2006)* have revealed, specifically in the cerebral cortex, an increase in the ratio APP770-751/APP695, considered as an important clue to the etiology of amyloid deposition and also of plaque formation in AD (*Johnson et al. 1990*), in rats fed a vitamin A-free diet for 13 weeks.

Rats fed a vitamin A-free diet for 14 weeks displayed a hyposignalling RA pathway characterized by a decrease in  $RAR\beta$  mRNA level in the striatum (data not shown), hippocampus and cerebral cortex. This alteration of vitamin A signalling pathway was accompanied by an increased mRNA amount of ADAM10, BACE and PS1, three RA target genes involved in non amyloidogenic and amyloidogenic pathways of the APP processing. These results, which may be associated with the decreased RA bioavailability, differed from those obtained by several authors showing, mainly *in vitro*, a positive regulation of these

genes by RA (Johnson *et al.* 1990; Satoh and Kuroda 2000; Flood *et al.* 2004; Lane and Bailey 2005; Prinzen *et al.* 2005). Husson *et al.* (2006) have suggested that from 13 weeks of depleted diet, vitamin A deficiency seems to be associated with adaptative processes, so called allostatic state, suggesting that many physiological functions are mobilized and become stabilized at new levels far from homeostatic equilibrium. This process of apparent stability can return from homeostatic state or can lead to breakdown and illness with a continuing lack (Koob and Le Moal 2001). Thus, in our opinion, 14 weeks of deprived diet induces physiological dysregulation in the modulation of RA target genes.

#### ***4.1.1 Effect of vitamin A deficiency on the non amyloidogenic pathway of the APP processing***

The non amyloidogenic pathway of APP processing involves APP cleavage within the A $\beta$  sequence by  $\alpha$  secretase, precluding the A $\beta$  formation. The N-terminal domain of APP releasing, i.e. APP $\alpha$ , has neuroprotective properties (Allinson *et al.* 2003; Kojro and Fahrenholz 2005; Bell *et al.* 2008). ADAM10, a member of ADAM (a disintegrin and metalloproteinase) family of proteinases, acts as an efficient  $\alpha$ -secretase (Tippmann *et al.* 2009). (Prinzen *et al.* 2005) have identified RA as an inducer of human ADAM10 promoter activity. Also, it was recently reported that RA increased both mRNA and protein levels of ADAM10 in SH-SY5Y cells (Endres *et al.* 2005). In VAD rats which display a vitamin A hyposignalling, no difference was observed for ADAM10 protein level and for  $\alpha$ -secretase activity. Thus, cleavage of APP via a non amyloidogenic pathway was preserved after 14 weeks of deprived diet in spite of physiological dysregulation in the modulation of RA target genes.

#### ***4.1.2 Effect of vitamin A deficiency on amyloidogenic pathway of the APP processing***

(Fahrenholz and Postina 2006) have demonstrated a competition of the  $\alpha$ -secretase ADAM10 with the  $\beta$ -secretase BACE for the substrate APP. In the present work, the BACE mRNA content increased in the hippocampus and cortex of VAD rats compared to the controls. Regarding BACE protein level and  $\beta$  secretase activity, no difference upper than 12% was observed in the vitamin A deprived rat cortex or hippocampus as compared to the controls. There is a longstanding controversy as to which BACE transcript is up- or non-regulated in amyloidogenic diseases. Nevertheless, no change in mRNA level of BACE has been described in the brain of AD patients who suffer a high load of A $\beta$  plaque formation (Gatta *et al.* 2002; Zohar *et al.* 2005). An increase of BACE activity has been demonstrated in

the cerebral cortex of sporadic AD and considered as a potential cause of A $\beta$  accumulation (Holsinger et al. 2002; Zohar et al. 2003; Fukumoto et al. 2004). It has been shown that increase in  $\beta$ -secretase activity is due to numerous post-translational modifications and more precisely to posttranslational stabilization following caspase activation (Benjannet et al. 2001; Tesco et al. 2007). Recently (Borghini et al. 2006) have investigated the expression, protein levels and activity of BACE in brain tissues samples obtained from AD, controls (CTR) as well as in subjects with abundant amyloid plaques in absence of DNF (NA). Our results are similar of those obtained in NA subjects since an increased level about 22% of BACE mRNA level has been observed without any modification of its protein level and enzymatic activity in the cortex. In AD subject, the activity of BACE is increased with a normal gene expression and a non-statistically significant increase of BACE expression (+20%). Thus we hypothesized that 14 weeks of VAD lead to advance allostatic state characterized by a few modifications of amyloidogenic pathway without leading to AD pathology.

Concerning PS1, VAD increased PS1 mRNA and protein levels together with  $\gamma$ -secretase activity in the cortex of vitamin A deprived rats compared to the control animals. Presenilins (PS1 and PS2), two RA target genes, are critical components of a large enzyme complex that performs  $\gamma$ -secretase cleavage (Culvenor et al. 2000; Wolfe and Haass 2001; Flood et al. 2004; Steiner et al. 2008). Recently, it has been shown that the C terminus of PS1 is essential for  $\gamma$ -secretase activity (Selkoe 2001; Laudon et al. 2007). An increased amount of PS1 may be the cause of aberrant processing of APP, resulting in A $\beta$  accumulation (Moreno-Flores et al. 1999; Xia 2000; Xia et al. 2000; Kumar et al. 2009). In the present study, the amount of A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42 peptides levels was unchanged in the cortex and in the hippocampus of vitamin A deprived rats compared to the control animals. These results argue for a dysregulation of APP processing in vitamin A depleted rats in favour of amyloidogenic pathway, without leading to accumulation of A $\beta$  and thus to AD pathology. IDE is one of the proteins that have been demonstrated to play a key role in degrading A $\beta$  monomer *in vitro* and *in vivo*; the reduced level of IDE seems associated with increased A $\beta$  monomer levels (Zhao et al. 2004; Leal et al. 2006; Miners et al. 2008). Inversely, ApoD, whose expression is increased in AD, may function to facilitate aggregation of A $\beta$  (Desai et al. 2005; Muffat et al. 2008). Since the effect of vitamin A deficiency was much stronger on ApoD than on IDE expression, a facilitate aggregation of A $\beta$  could be expected in vitamin A depleted rats.

## 4.2 Effect of RA administration on APP processing in the brain of vitamin A deprived rats for 14 weeks

RA administration was able to restore its own nuclear receptors mRNA levels in all brain structures studied. This treatment has no effect on the non amyloidogenic of the APP processing in the two areas studied. Concerning amyloidogenic pathway, RA administration induced protein level and enzymatic activity of BACE as compared to the VAD rats in the hippocampus. These modifications were accompanied by a significant increased of A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42. *Li et al. (2006)* have demonstrated in the pathological condition that the increase in BACE can induce A $\beta$  production. The higher protein level of PS1 in VAD rats with or without subsequent RA administration is coherent with an aberrant processing of APP resulting in A $\beta$  accumulation in VAD rats administrated by RA as described by several authors (*Moreno-Flores et al. 1999; Xia et al. 2000; Kumar et al. 2009*). Together, these results which let us suppose a shift towards the  $\beta$ -secretase pathway by RA administration in the hippocampus, differ from those described in the literature showing that RA treatment stimulates  $\alpha$ -secretase processing of APP and decreases  $\beta$ -secretase cleavage *in vitro* (*Prinzen et al. 2005; Holback et al. 2008*). In the same way, *Ding et al. (2008)* have shown that RA treatment significantly attenuated A $\beta$  level in both the hippocampus and cortex.

In the cerebral cortex, since RA treatment reduced the RA hyposignalling related protein level of BACE and PS1 of about 15%, our results remain in agreement with those obtained by *Borghini et al. (2006)* in subjects with abundant amyloid plaques in absence of DNF. The significant increased of A $\beta$ -40 observed in this area could be associated with the higher increased of ApoD protein observed in VAD rats administrated by RA since A $\beta$ -42, whose level was unchanged by this treatment, is more prone to aggregate than A $\beta$ -40.

### Conclusion

The present data reveal a vitamin A deficiency-related dysregulation of the amyloid pathway in the cortex of rats, which is known to be the first brain area altered by AD development. In this area, 14 weeks of deprived diet induces physiological dysregulation in the modulation of RA target genes leading to an increased amount of ADAM10, BACE and PS1, with some modifications in amyloidogenic pathway but without increased amount of A $\beta$  peptides. Vitamin A deprived diet for 14 weeks seems to be associated with adaptative processes, so called allostatic state, suggesting that many physiological functions are

mobilized and become stabilized at new levels far from homeostatic equilibrium. Sterling and Eyer (1988) has described that this process of apparent stability can return from homeostatic state or can lead to breakdown and illness with a continuing lack. In the present study, RA administration stimulates amyloidogenic pathway of APP that leads to A $\beta$  formation. It is well known that retinoid and thyroid hormones signalling are in close relationship (*Ingenbleek and De Visscher 1979; Higuieret and Garcin 1984; Schrader and Carlberg 1994; Chin and Yen 1996; Sanno et al. 1997*). In previous studies, we have shown that alteration of T3 signalling pathway associated with VAD or aging become a limiting factor, which impedes RA from exerting its modulating effect (*Husson et al. 2003; Husson et al. 2004; Feart et al. 2005*). Thus, in order to extend this present study, it would be interesting to study the effect of hypothyroidism on APP processing pathways since it is known that an adult onset of hypothyroid model induces an important collapse of retinoid signalling (*Pallet et al. 1994; Feart et al. 2005*). The incidence of hypothyroidism increases with age and localized hypothyroidism of central nervous system has been reported in some patients with AD. Moreover, a direct relationship between thyroid hormones and AD has been suggested since thyroid hormones are a negative regulator of APP gene expression (*O'Barr et al. 2006*).

## Tables et Figures :

**Table 1: Sequences forward (F) and reverse (R) primers used for Light Cycler real-time polymerase chain reaction (PCR) and size of amplicon.**

Gene	Sequence 5' → 3'	Product length (pb)
<b>PPIB</b>	F: GTTCTGGAAGGCATGGATGT R: TCCCCGAGGCTCTCTACT	153
<b>RARβ</b>	F: CAGCTGGGTAAATACACCACGAA R:GGGGTATACCTGGTACAAATTCTGA	227
<b>BACE</b>	F: AGACGCTCAACATCCTGGTG R: CCTGGGIGTAGGGCACATAC	110
<b>ADAM10</b>	F: TGTGGAAATGGGATGGTGGA R: TTCTTCCCCCTCTGGCTGGTTT	104
<b>PS1</b>	F: CCAGGCAGGTGATAGAGCAAGA R: CACCACAACGACCATGCAGA	116
<b>ApoD</b>	F: TCCTTACCTCCCTCCAGAAACAA R: CTTTACAGGAAGTCCGGGCAGT	118
<b>IDE</b>	F: ACCAGCGGAGAACACACCAA R: GCATCAAACAAGGGGCACAG	111

**Table 2: Effect of vitamin A-deficiency for 14 weeks with or without RA treatment on the level of Aβ peptides in the hippocampus and cerebral cortex of rats**

	Aβ 40		Aβ 42	
	Hippocampus	Cerebral cortex	Hippocampus	Cerebral cortex
<b>Controls</b>	9.81 ± 0.38	10.14 ± 0.36	0.478 ± 0.019	0.316 ± 0.011
<b>Depleted</b>	9.11 ± 0.47	9.34 ± 0.35	0.429 ± 0.016	0.208 ± 0.007
<b>Depleted + RA</b>	13.24 ± 0.52 <sup>#</sup>	11.24 ± 0.46 <sup>#</sup>	0.602 ± 0.033 <sup>#</sup>	0.298 ± 0.016

Data represent mean ± SEM of measures performed on eight animals by Elisa.

\* p < 0.05 compared with controls; # p < 0.05 compared with depleted

**Table 3: Effect of vitamin A-deficiency for 14 weeks with or without RA treatment on the expression of IDE in the hippocampus and cerebral cortex of rats**

	Hippocampus		Cortex	
	mRNA (% PPIB)	Protein	mRNA (% PPIB)	Protein
<b>Controls</b>	0,97 ± 0.02	21465 ± 1820	1,05 ± 0.07	15515 ± 1698
<b>Depleted</b>	1.00 ± 0.03	20173 ± 1574	1.09 ± 0.07	19587 ± 1492
<b>Depleted + RA</b>	1.10 ± 0.03 <sup>#</sup>	19757 ± 0680	0.97 ± 0.04	21038 ± 0616

Data represent mean ± SEM of measures performed on seven or six animals respectively for real time PCR and for western blot.

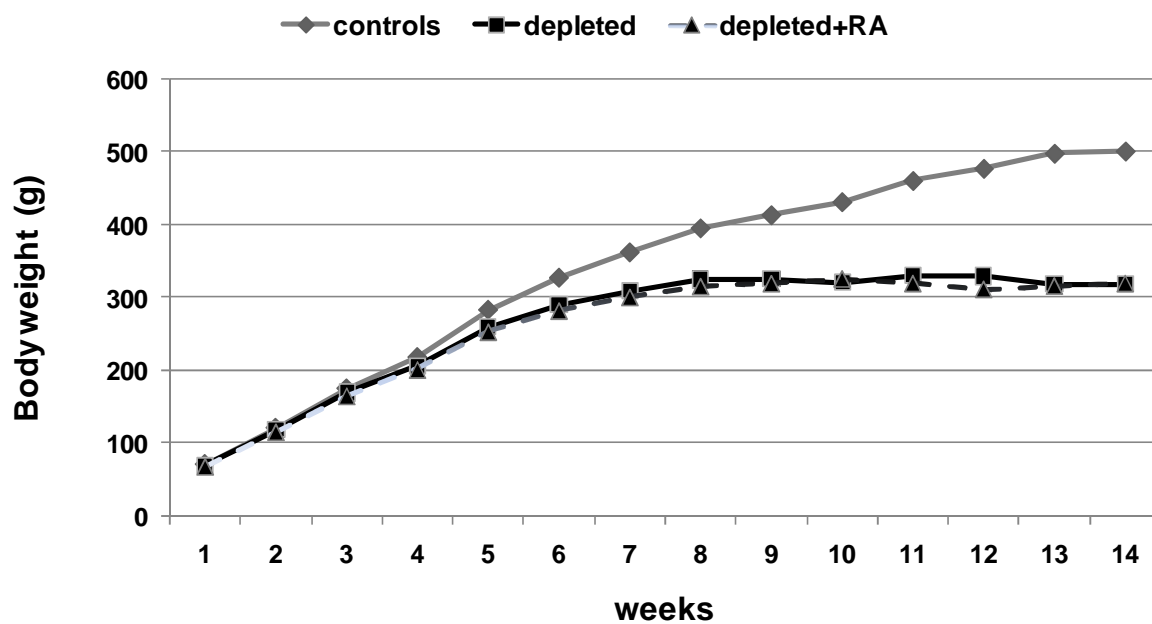
\*p < 0.05 compared with controls; # p < 0.05 compared with depleted

**Table 4: Effect of vitamin A-deficiency for 14 weeks with or without RA treatment on the expression of ApoD in the hippocampus and cerebral cortex of rats**

	Hippocampus		Cortex	
	mRNA (% PPIB)	Protein	mRNA (% PPIB)	Protein
<b>Controls</b>	1,15 ± 0.05	4557 ± 827	2.33 ± 0.17	8122 ± 0898
<b>Depleted</b>	1.17 ± 0.08	5724 ± 200	1.79 ± 0.21	11370 ± 0850*
<b>Depleted + RA</b>	0.93 ± 0.08	6764 ± 692	2.08 ± 0.20	17447 ± 0872 <sup>#</sup>

Data represent mean ± SEM of measures performed on seven or six animals respectively for real time PCR and for western blot.

\*p < 0.05 compared with controls; # p < 0.05 compared with depleted



**Figure 1**

Effect of a vitamin A-free diet with or without RA treatment on body weight.

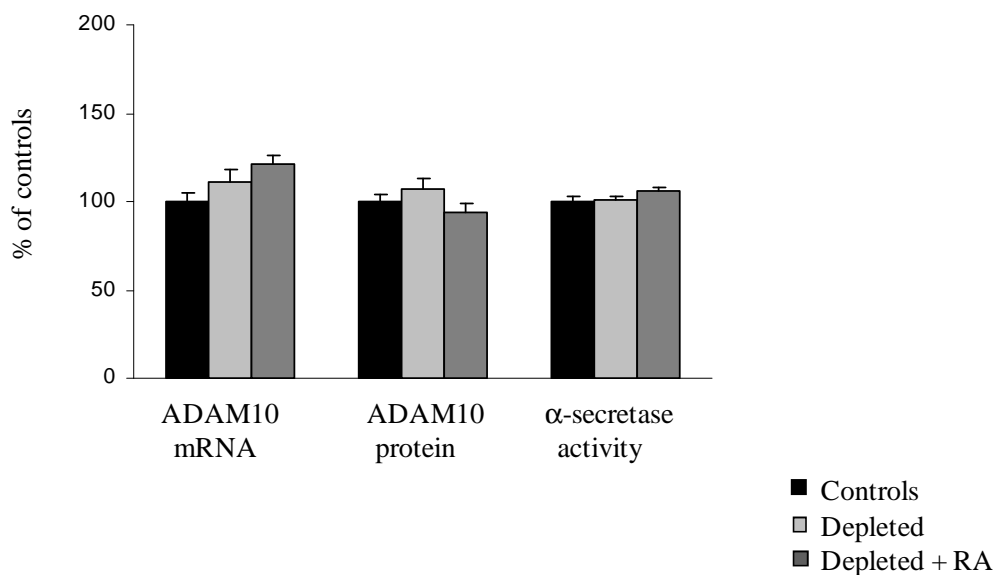
Each point is the mean for twenty-four rats.

\* Mean value was significantly different from that of control animals.

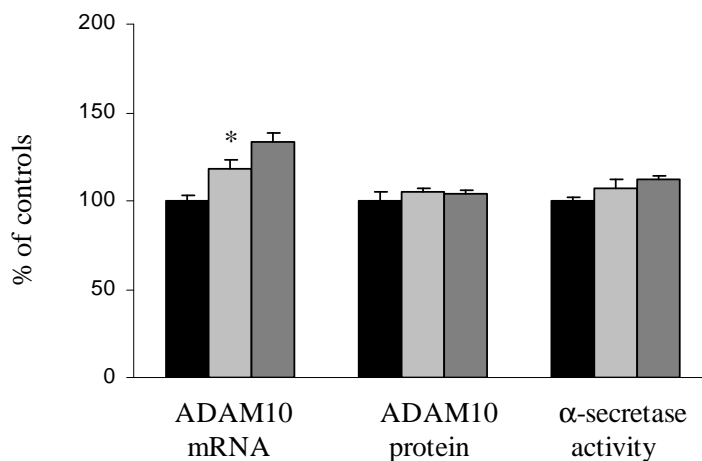


Figure 2

## (a) Hippocampus



## (b) Cortex



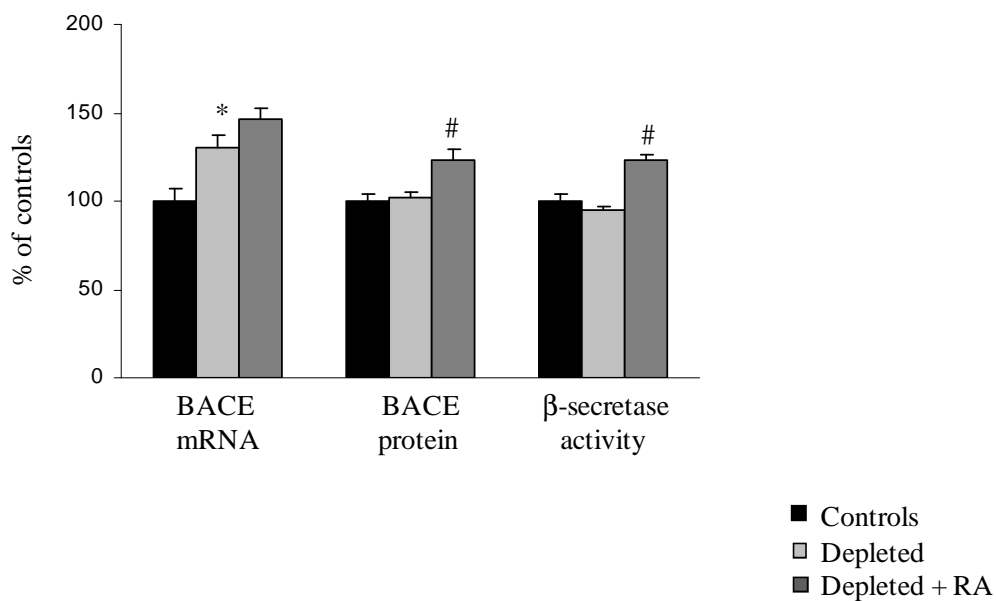
**Figure 2** : ADAM10 mRNA and protein levels and  $\alpha$ -secretase enzymatic activity in hippocampus (a) and cerebral cortex (b) of 14 week- vitamin A deprived rats treated with RA or not.

Data represent mean values of measures performed on seven animals for mRNA level and six animals for protein level and enzymatic activity, with the standard error represented by vertical bars.

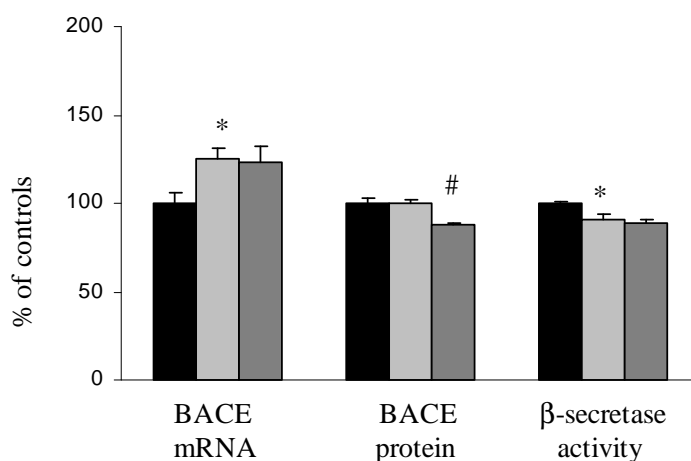
\* mean value was significantly different from control rats ( $p < 0.05$ )

Figure 3

(a) Hippocampus



(b) Cortex



**Figure 3** : BACE mRNA and protein levels and  $\beta$ -secretase enzymatic activity in hippocampus (a) and cerebral cortex (b) of 14 week- vitamin A deprived rats treated with RA or not.

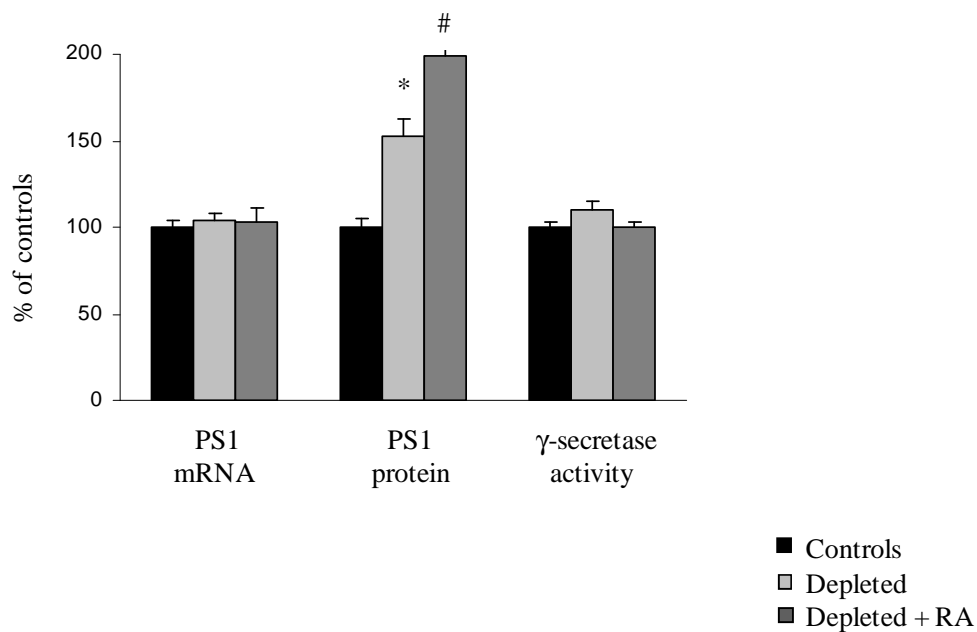
Data represent mean values of measures performed on seven animals for mRNA level and six animals for protein level and enzymatic activity, with the standard error represented by vertical bars.

\* mean value was significantly different from control rats ( $p < 0.05$ )

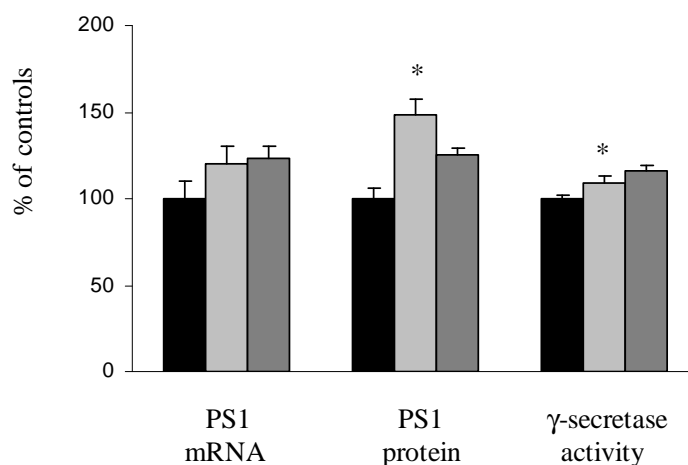
# mean value was significantly different from depleted rats ( $p < 0.05$ )

Figure 4

## (a) Hippocampus



## (b) Cortex



**Figure 4 :** PS1 mRNA and protein levels and  $\gamma$ -secretase enzymatic activity in hippocampus (a) and cerebral cortex (b) of 14 week- vitamin A deprived rats treated with RA or not.

Data represent mean values of measures performed on seven animals for mRNA level and six animals for protein level and enzymatic activity, with the standard error represented by vertical bars.

\* mean value was significantly different from control rats ( $p < 0.05$ )

# mean value was significantly different from depleted rats ( $p < 0.05$ )

**References :**

- Allinson, T.M., Parkin, E.T., Turner, A.J., Hooper, N.M. 2003. ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases. *J Neurosci Res* 74(3), 342-52.
- Bell, K.F., Zheng, L., Fahrenholz, F., Cuello, A.C. 2008. ADAM-10 over-expression increases cortical synaptogenesis. *Neurobiol Aging* 29(4), 554-65.
- Benjannet, S., Elagoz, A., Wickham, L., Mamarbachi, M., Munzer, J.S., Basak, A., Lazure, C., Cromlish, J.A., Sisodia, S., Checler, F., Chretien, M., Seidah, N.G. 2001. Post-translational processing of beta-secretase (beta-amyloid-converting enzyme) and its ectodomain shedding. The pro- and transmembrane/cytosolic domains affect its cellular activity and amyloid-beta production. *J Biol Chem* 276(14), 10879-87.
- Bonnet, E., Touyarot, K., Alfos, S., Pallet, V., Higuieret, P., Abrous, D.N. 2008. Retinoic acid restores adult hippocampal neurogenesis and reverses spatial memory deficit in vitamin A deprived rats. *PLoS ONE* 3(10), e3487.
- Borghgi, R., Patriarca, S., Traverso, N., Piccini, A., Storace, D., Garuti, A., Cirmena, G., Odetti, P., Tabaton, M. 2006. The increased activity of BACE1 correlates with oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*.
- Chin, W.W., Yen, P.M. 1996. T3 or not T3--the slings and arrows of outrageous TR function. *Endocrinology* 137(2), 387-8.
- Connor, M.J., Sidell, N. 1997. Retinoic acid synthesis in normal and Alzheimer diseased brain and human neural cells. *Mol Chem Neuropathol* 30(3), 239-52.
- Corcoran, J.P., So, P.L., Maden, M. 2004. Disruption of the retinoid signalling pathway causes a deposition of amyloid beta in the adult rat brain. *Eur J Neurosci* 20(4), 896-902.
- Culvenor, J.G., Evin, G., Cooney, M.A., Wardan, H., Sharples, R.A., Maher, F., Reed, G., Diehlmann, A., Weidemann, A., Beyreuther, K., Masters, C.L. 2000. Presenilin 2 expression in neuronal cells: induction during differentiation of embryonic carcinoma cells. *Exp Cell Res* 255(2), 192-206.
- Desai, P.P., Ikonovic, M.D., Abrahamson, E.E., Hamilton, R.L., Isanski, B.A., Hope, C.E., Klunk, W.E., DeKosky, S.T., Kamboh, M.I. 2005. Apolipoprotein D is a component of compact but not diffuse amyloid-beta plaques in Alzheimer's disease temporal cortex. *Neurobiol Dis* 20(2), 574-82.
- Ding, Y., Qiao, A., Wang, Z., Goodwin, J.S., Lee, E.S., Block, M.L., Allsbrook, M., McDonald, M.P., Fan, G.H. 2008. Retinoic acid attenuates beta-amyloid deposition and rescues memory deficits in an Alzheimer's disease transgenic mouse model. *J Neurosci* 28(45), 11622-34.
- Duyckaerts, C. 2004. Looking for the link between plaques and tangles. *Neurobiol Aging* 25(6), 735-9; discussion 43-6.
- Edelberg, H.K., Wei, J.Y. 1996. The biology of Alzheimer's disease. *Mech Ageing Dev* 91(2), 95-114.
- Enderlin, V., Pallet, V., Alfos, S., Dargelos, E., Jaffard, R., Garcin, H., Higuieret, P. 1997. Age-related decreases in mRNA for brain nuclear receptors and target genes are reversed by retinoic acid treatment. *Neurosci Lett* 229(2), 125-9.

- Endres, K., Postina, R., Schroeder, A., Mueller, U., Fahrenholz, F. 2005. Shedding of the amyloid precursor protein-like protein APLP2 by disintegrin-metalloproteinases. *Febs J* 272(22), 5808-20.
- Etchamendy, N., Enderlin, V., Marighetto, A., Pallet, V., Higuieret, P., Jaffard, R. 2003. Vitamin A deficiency and relational memory deficit in adult mice: relationships with changes in brain retinoid signalling. *Behav Brain Res* 145(1-2), 37-49.
- Etchamendy, N., Enderlin, V., Marighetto, A., Vouimba, R.M., Pallet, V., Jaffard, R., Higuieret, P. 2001. Alleviation of a selective age-related relational memory deficit in mice by pharmacologically induced normalization of brain retinoid signaling. *J Neurosci* 21(16), 6423-9.
- Fahrenholz, F., Postina, R. 2006. Alpha-secretase activation--an approach to Alzheimer's disease therapy. *Neurodegener Dis* 3(4-5), 255-61.
- Feart, C., Mingaud, F., Enderlin, V., Husson, M., Alfos, S., Higuieret, P., Pallet, V. 2005. Differential effect of retinoic acid and triiodothyronine on the age-related hypo-expression of neurogranin in rat. *Neurobiol Aging* 26(5), 729-38.
- Feart, C., Pallet, V., Boucheron, C., Higuieret, D., Alfos, S., Letenneur, L., Dartigues, J.F., Higuieret, P. 2005. Aging affects the retinoic acid and the triiodothyronine nuclear receptor mRNA expression in human peripheral blood mononuclear cells. *Eur J Endocrinol* 152(3), 449-58.
- Feart, C., Vallortigara, J., Higuieret, D., Gatta, B., Tabarin, A., Enderlin, V., Higuieret, P., Pallet, V. 2005. Decreased expression of retinoid nuclear receptor (RAR alpha and RAR gamma) mRNA determined by real-time quantitative RT-PCR in peripheral blood mononuclear cells of hypothyroid patients. *J Mol Endocrinol* 34(3), 849-58.
- Flood, F., Sundstrom, E., Samuelsson, E.B., Wiehager, B., Seiger, A., Johnston, J.A., Cowburn, R.F. 2004. Presenilin expression during induced differentiation of the human neuroblastoma SH-SY5Y cell line. *Neurochem Int* 44(7), 487-96.
- Fukumoto, H., Rosene, D.L., Moss, M.B., Raju, S., Hyman, B.T., Irizarry, M.C. 2004. Beta-secretase activity increases with aging in human, monkey, and mouse brain. *Am J Pathol* 164(2), 719-25.
- Gatta, L.B., Albertini, A., Ravid, R., Finazzi, D. 2002. Levels of beta-secretase BACE and alpha-secretase ADAM10 mRNAs in Alzheimer hippocampus. *Neuroreport* 13(16), 2031-3.
- Goodman, A.B. 2006. Retinoid receptors, transporters, and metabolizers as therapeutic targets in late onset Alzheimer disease. *J Cell Physiol* 209(3), 598-603.
- Goodman, A.B., Pardee, A.B. 2003. Evidence for defective retinoid transport and function in late onset Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(5), 2901-5.
- Higuieret, P., Garcin, H. 1984. Triiodothyronine and vitamin A-deficiency in the rat. *J Physiol (Paris)* 79(5), 373-7.
- Holback, S., Adlerz, L., Gatsinzi, T., Jacobsen, K.T., Iverfeldt, K. 2008. PI3-K- and PKC-dependent up-regulation of APP processing enzymes by retinoic acid. *Biochem Biophys Res Commun* 365(2), 298-303.

- Holback, S., Adlerz, L., Iverfeldt, K. 2005. Increased processing of APLP2 and APP with concomitant formation of APP intracellular domains in BDNF and retinoic acid-differentiated human neuroblastoma cells. *J Neurochem* 95(4), 1059-68.
- Holsinger, R.M., McLean, C.A., Beyreuther, K., Masters, C.L., Evin, G. 2002. Increased expression of the amyloid precursor beta-secretase in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 51(6), 783-6.
- Husson, M., Enderlin, V., Alfos, S., Boucheron, C., Pallet, V., Higuieret, P. 2004. Expression of neurogranin and neuromodulin is affected in the striatum of vitamin A-deprived rats. *Brain Res Mol Brain Res* 123(1-2), 7-17.
- Husson, M., Enderlin, V., Alfos, S., Feart, C., Higuieret, P., Pallet, V. 2003. Triiodothyronine administration reverses vitamin A deficiency-related hypo-expression of retinoic acid and triiodothyronine nuclear receptors and of neurogranin in rat brain. *Br J Nutr* 90(1), 191-8.
- Husson, M., Enderlin, V., Delacourte, A., Ghenimi, N., Alfos, S., Pallet, V., Higuieret, P. 2006. Retinoic acid normalizes nuclear receptor mediated hypo-expression of proteins involved in beta-amyloid deposits in the cerebral cortex of vitamin A deprived rats. *Neurobiol Dis* 23(1), 1-10.
- Ingenbleek, Y., De Visscher, M. 1979. Hormonal and nutritional status: critical conditions for endemic goiter epidemiology? *Metabolism* 28(1), 9-19.
- Irizarry, M.C., Hyman, B.T. 2001. Alzheimer disease therapeutics. *J Neuropathol Exp Neurol* 60(10), 923-8.
- Irizarry, M.C., Locascio, J.J., Hyman, B.T. 2001. beta-site APP cleaving enzyme mRNA expression in APP transgenic mice: anatomical overlap with transgene expression and static levels with aging. *Am J Pathol* 158(1), 173-7.
- Jimenez-Jimenez, F.J., Molina, J.A., de Bustos, F., Orti-Pareja, M., Benito-Leon, J., Tallon-Barranco, A., Gasalla, T., Porta, J., Arenas, J. 1999. Serum levels of beta-carotene, alpha-carotene and vitamin A in patients with Alzheimer's disease. *Eur J Neurol* 6(4), 495-7.
- Johnson, S.A., McNeill, T., Cordell, B., Finch, C.E. 1990. Relation of neuronal APP-751/APP-695 mRNA ratio and neuritic plaque density in Alzheimer's disease. *Science* 248(4957), 854-7.
- Kojro, E., Fahrenholz, F. 2005. The non-amyloidogenic pathway: structure and function of alpha-secretases. *Subcell Biochem* 38, 105-27.
- Kumar, V.B., Franko, M., Banks, W.A., Kasinadhuni, P., Farr, S.A., Vyas, K., Choudhuri, V., Morley, J.E. 2009. Increase in presenilin 1 (PS1) levels in senescence-accelerated mice (SAMP8) may indirectly impair memory by affecting amyloid precursor protein (APP) processing. *J Exp Biol* 212(Pt 4), 494-8.
- Lane, M.A., Bailey, S.J. 2005. Role of retinoid signalling in the adult brain. *Prog Neurobiol* 75(4), 275-93.
- Laudon, H., Winblad, B., Naslund, J. 2007. The Alzheimer's disease-associated gamma-secretase complex: functional domains in the presenilin 1 protein. *Physiol Behav* 92(1-2), 115-20.
- Leal, M.C., Dorfman, V.B., Gamba, A.F., Frangione, B., Wisniewski, T., Castano, E.M., Sigurdsson, E.M., Morelli, L. 2006. Plaque-associated overexpression of insulin-degrading enzyme in the

- cerebral cortex of aged transgenic tg2576 mice with Alzheimer pathology. *J Neuropathol Exp Neurol* 65(10), 976-87.
- Li, Y., Zhou, W., Tong, Y., He, G., Song, W. 2006. Control of APP processing and Abeta generation level by BACE1 enzymatic activity and transcription. *Faseb J* 20(2), 285-92.
- Maden, M. 2007. Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 8(10), 755-65.
- Marill, J., Idres, N., Capron, C.C., Nguyen, E., Chabot, G.G. 2003. Retinoic acid metabolism and mechanism of action: a review. *Curr Drug Metab* 4(1), 1-10.
- Melino, G., Draoui, M., Bernardini, S., Bellincampi, L., Reichert, U., Cohen, P. 1996. Regulation by retinoic acid of insulin-degrading enzyme and of a related endoprotease in human neuroblastoma cell lines. *Cell Growth Differ* 7(6), 787-96.
- Miller, B.C., Eckman, E.A., Sambamurti, K., Dobbs, N., Chow, K.M., Eckman, C.B., Hersh, L.B., Thiele, D.L. 2003. Amyloid-beta peptide levels in brain are inversely correlated with insulin activity levels in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(10), 6221-6.
- Miners, J.S., Baig, S., Palmer, J., Palmer, L.E., Kehoe, P.G., Love, S. 2008. Abeta-degrading enzymes in Alzheimer's disease. *Brain Pathol* 18(2), 240-52.
- Mingaud, F., Mormede, C., Etchamendy, N., Mons, N., Niedergang, B., Wietrych, M., Pallet, V., Jaffard, R., Krezel, W., Higuere, P., Marighetto, A. 2008. Retinoid hyposignaling contributes to aging-related decline in hippocampal function in short-term/working memory organization and long-term declarative memory encoding in mice. *J Neurosci* 28(1), 279-91.
- Mishizen-Eberz, A.J., Rissman, R.A., Carter, T.L., Ikonovic, M.D., Wolfe, B.B., Armstrong, D.M. 2004. Biochemical and molecular studies of NMDA receptor subunits NR1/2A/2B in hippocampal subregions throughout progression of Alzheimer's disease pathology. *Neurobiol Dis* 15(1), 80-92.
- Moreno-Flores, M.T., Medina, M., Wandosell, F. 1999. Expression of presenilin 1 in nervous system during rat development. *J Comp Neurol* 410(4), 556-70.
- Muffat, J., Walker, D.W., Benzer, S. 2008. Human ApoD, an apolipoprotein up-regulated in neurodegenerative diseases, extends lifespan and increases stress resistance in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(19), 7088-93.
- O'Barr, S.A., Oh, J.S., Ma, C., Brent, G.A., Schultz, J.J. 2006. Thyroid hormone regulates endogenous amyloid-beta precursor protein gene expression and processing in both in vitro and in vivo models. *Thyroid* 16(12), 1207-13.
- Ono, K., Yoshiike, Y., Takashima, A., Hasegawa, K., Naiki, H., Yamada, M. 2004. Vitamin A exhibits potent anti-amyloidogenic and fibril-destabilizing effects in vitro. *Exp Neurol* 189(2), 380-92.
- Pallet, V., Audouin-Chevallier, I., Verret, C., Garcin, H., Higuere, P. 1994. Retinoic acid differentially modulates triiodothyronine and retinoic acid receptors in rat liver according to thyroid status. *Eur J Endocrinol* 131(4), 377-84.

- Perez, A., Morelli, L., Cresto, J.C., Castano, E.M. 2000. Degradation of soluble amyloid beta-peptides 1-40, 1-42, and the Dutch variant 1-40Q by insulin degrading enzyme from Alzheimer disease and control brains. *Neurochem Res* 25(2), 247-55.
- Preece, P., Virley, D.J., Costandi, M., Coombes, R., Moss, S.J., Mudge, A.W., Jazin, E., Cairns, N.J. 2004. Amyloid precursor protein mRNA levels in Alzheimer's disease brain. *Brain Res Mol Brain Res* 122(1), 1-9.
- Prinzen, C., Muller, U., Endres, K., Fahrenholz, F., Postina, R. 2005. Genomic structure and functional characterization of the human ADAM10 promoter. *Faseb J* 19(11), 1522-4.
- Sahin, M., Karauzum, S.B., Perry, G., Smith, M.A., Aliciguzel, Y. 2005. Retinoic acid isomers protect hippocampal neurons from amyloid-beta induced neurodegeneration. *Neurotox Res* 7(3), 243-50.
- Saido, T.C., Yamao-Harigaya, W., Iwatsubo, T., Kawashima, S. 1996. Amino- and carboxyl-terminal heterogeneity of beta-amyloid peptides deposited in human brain. *Neurosci Lett* 215(3), 173-6.
- Sanno, N., Sugawara, A., Teramoto, A., Abe, Y., Yen, P.M., Chin, W.W., Osamura, R.Y. 1997. Immunohistochemical expression of retinoid X receptor isoforms in human pituitaries and pituitary adenomas. *Neuroendocrinology* 65(4), 299-306.
- Satoh, J., Kuroda, Y. 2000. Amyloid precursor protein beta-secretase (BACE) mRNA expression in human neural cell lines following induction of neuronal differentiation and exposure to cytokines and growth factors. *Neuropathology* 20(4), 289-96.
- Schrader, M., Carlberg, C. 1994. Thyroid hormone and retinoic acid receptors form heterodimers with retinoid X receptors on direct repeats, palindromes, and inverted palindromes. *DNA Cell Biol* 13(4), 333-41.
- Selkoe, D.J. 2001. Alzheimer's disease results from the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein. *J Alzheimers Dis* 3(1), 75-80.
- Selkoe, D.J. 2002. Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science* 298(5594), 789-91.
- Shoji, M., Golde, T.E., Ghiso, J., Cheung, T.T., Estus, S., Shaffer, L.M., Cai, X.D., McKay, D.M., Tintner, R., Frangione, B., et al. 1992. Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing. *Science* 258(5079), 126-9.
- Steiner, H., Fluhrer, R., Haass, C. 2008. Intramembrane proteolysis by gamma-secretase. *J Biol Chem* 283(44), 29627-31.
- Sterling, P., Eyer, J. 1988. Allotaxis: a new paradigm to explain arousal pathology. *Handbook of life stress, cognition and health* New-York: Wiley, 629-49.
- Tesco, G., Koh, Y.H., Kang, E.L., Cameron, A.N., Das, S., Sena-Estevés, M., Hiltunen, M., Yang, S.H., Zhong, Z., Shen, Y., Simpkins, J.W., Tanzi, R.E. 2007. Depletion of GGA3 stabilizes BACE and enhances beta-secretase activity. *Neuron* 54(5), 721-37.
- Thal, D.R., Braak, H. 2005. [Post-mortem diagnosis of Alzheimer's disease]. *Pathologie* 26(3), 201-13.
- Tippmann, F., Hundt, J., Schneider, A., Endres, K., Fahrenholz, F. 2009. Up-regulation of the {alpha}-secretase ADAM10 by retinoic acid receptors and acitretin. *Faseb J*.



- Vassar, R. 2004. BACE1: the beta-secretase enzyme in Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci* 23(1-2), 105-14.
- Vickers, J.C., Dickson, T.C., Adlard, P.A., Saunders, H.L., King, C.E., McCormack, G. 2000. The cause of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* 60(2), 139-65.
- Vingtdeux, V., Hamdane, M., Gompel, M., Begard, S., Drobecq, H., Ghestem, A., Grosjean, M.E., Kostanjevecki, V., Grognet, P., Vanmechelen, E., Buee, L., Delacourte, A., Sergeant, N. 2005. Phosphorylation of amyloid precursor carboxy-terminal fragments enhances their processing by a gamma-secretase-dependent mechanism. *Neurobiol Dis* 20(2), 625-37.
- Wolfe, M.S., Haass, C. 2001. The Role of presenilins in gamma-secretase activity. *J Biol Chem* 276(8), 5413-6.
- Xia, W. 2000. Role of presenilin in gamma-secretase cleavage of amyloid precursor protein. *Exp Gerontol* 35(4), 453-60.
- Xia, W., Ray, W.J., Ostaszewski, B.L., Rahmati, T., Kimberly, W.T., Wolfe, M.S., Zhang, J., Goate, A.M., Selkoe, D.J. 2000. Presenilin complexes with the C-terminal fragments of amyloid precursor protein at the sites of amyloid beta-protein generation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(16), 9299-304.
- Zaman, Z., Roche, S., Fielden, P., Frost, P.G., Niriella, D.C., Cayley, A.C. 1992. Plasma concentrations of vitamins A and E and carotenoids in Alzheimer's disease. *Age Ageing* 21(2), 91-4.
- Zhao, L., Teter, B., Morihara, T., Lim, G.P., Ambegaokar, S.S., Ubeda, O.J., Frautschy, S.A., Cole, G.M. 2004. Insulin-degrading enzyme as a downstream target of insulin receptor signaling cascade: implications for Alzheimer's disease intervention. *J Neurosci* 24(49), 11120-6.
- Zohar, O., Cavallaro, S., D'Agata, V., Alkon, D.L. 2003. Quantification and distribution of beta-secretase alternative splice variants in the rat and human brain. *Brain Res Mol Brain Res* 115(1), 63-8.
- Zohar, O., Pick, C.G., Cavallaro, S., Chapman, J., Katzav, A., Milman, A., Alkon, D.L. 2005. Age-dependent differential expression of BACE splice variants in brain regions of tg2576 mice. *Neurobiol Aging* 26(8), 1167-75.



# CHAPITRE IV

## HYPOTHYROIDIE ET PROCESSUS AMYLOIDOGENE

Les résultats obtenus chez les rats carencés en vitamine A ont mis en évidence une modification du processus de dégradation de la protéine APP, privilégiant la voie amyloïdogénique, sans toutefois qu'une augmentation du taux de peptides A $\beta$  soit à ce stade décelable. L'existence de fortes interactions entre la voie de signalisation des rétinoides et celle des hormones thyroïdiennes (HT) est aujourd'hui bien décrite. Par ailleurs, des données de la littérature suggèrent l'intervention des hormones thyroïdiennes dans la MA. L'ensemble de ces données nous a conduit à nous interroger sur l'implication de la voie de signalisation des hormones thyroïdiennes dans les processus de dégradation de la protéine APP. Dans ce contexte, notre travail a consisté à suivre les indicateurs des voies amyloïdogénique et physiologique de la dégradation de la protéine APP chez des animaux hypothyroïdiens dont on sait qu'ils présentent une atteinte simultanée des voies de signalisation de l'AR et de la T3 (forme active des hormones thyroïdiennes).

### 1. Introduction

Il est aujourd'hui admis que les hormones thyroïdiennes sont essentielles à la maturation du cerveau (*Smith et al. 2002; Bernal 2005*). Cependant, leur rôle dans le fonctionnement du cerveau mature est peu documenté, malgré leur présence à un taux très important dans le SNC. Des données bibliographiques ont montré que la T3 pourrait agir directement en tant que neurotransmetteur dans le SNC ou pourrait permettre leur libération (*Mason et al. 1993; Vara et al. 2002*). Les HT auraient aussi un rôle dans les relations entre les neurones et les cellules gliales qui sont d'une importance fondamentale dans l'organisation et le maintien de l'architecture du SNC, ainsi que dans la transmission synaptique (*Gomes et al. 1999*). Dans ce contexte, des études ont mis en évidence une implication des HT dans les processus qui contrôlent la plasticité synaptique (*Calza et al. 1997*). L'hypothyroïdie chez l'animal adulte s'accompagne de l'inhibition de la potentialisation à long terme dans la région CA1 et le gyrus dentelé de l'hippocampe (*Gilbert and Paczkowski 2003; Sui et al. 2006*), affecte le développement des dendrites des cellules pyramidales du champ CA1 de l'hippocampe (*Gould et al. 1990*) et entraîne des déficits mnésiques (*Dugbartey 1998; Gerges and Alkadhi 2004*).

Chez l'homme, la prévalence de l'hypothyroïdie augmente avec l'âge, surtout après 50 ans (*Burmeister et al. 2001; Miller et al. 2006*). Elle entraîne des déficits cognitifs, en particulier des troubles de la mémoire, des troubles neurologiques et psychiques et dans les cas liés au vieillissement ce statut peut entraîner des formes de démence. Au niveau comportemental, différentes manifestations sont recensées telles que les déficits d'attention, des troubles de l'humeur comme la dépression voire la manie, l'ataxie (trouble de la coordination des mouvements d'origine neurologique) (*Smith et al. 2002; Bauer et al. 2003; Roberts and Ladenson 2004*).

Nous avons vu dans le chapitre I que la vitamine A et les hormones thyroïdiennes interagissent au niveau nucléaire par l'intermédiaire de leurs récepteurs. L'AR agit via les récepteurs RAR et RXR qui s'hétérodimérisent afin de contrôler l'expression de nombreux gènes cibles. RXR peut également s'hétérodimériser avec d'autres récepteurs de la même superfamille et notamment avec les récepteurs TR qui sont spécifiques de la triiodothyronine (ou T3), forme active des hormones thyroïdiennes (*Chin and Yen 1996*). Deux gènes différents codent pour les TR : TR $\alpha$  et TR $\beta$ . La transcription du gène TR $\alpha$  produit deux ARNm majoritaires, qui sont ensuite traduits en TR $\alpha_1$  et TR $\alpha_2$  respectivement (*Mitsuhashi et al. 1988*). La présence de deux promoteurs différents et l'épissage alternatif en 5' du gène TR $\beta$  génèrent aussi plusieurs protéines dont deux majoritaires : TR $\beta_1$  et TR $\beta_2$  codées par deux ARNm différents (*Hodin et al. 1989*). Les TR et les RAR ont une forte homologie de structure et participent à la régulation de l'expression des gènes par des mécanismes similaires en tant que facteurs de transcription inductibles par leur ligand, en se liant spécifiquement sur les éléments de réponse TRE (thyroid hormone response element) (*Lazar 2003*). Parmi les gènes cibles de la T3 dans le cerveau adulte, on peut citer des gènes codant pour des protéines impliquées dans la plasticité synaptique telles que RC3 (neurogranine) ou Rhes (Ras Homolog Enriched in Striatum), des facteurs de croissance neuronaux (BDNF...) et la protéine APP (*Watson et al. 1994; Brambilla et al. 1997; Belandia et al. 1998; Latasa et al. 1998; Vallortigara et al. 2008*).

Des modifications du métabolisme et de la fonctionnalité de la vitamine A ont été décrites en situation d'hypothyroïdie (*Goswami and Choudhury 1999; Mesaros-Kanjski et al. 1999*). Les HT ont une influence sur la biodisponibilité de la vitamine A : elles faciliteraient l'absorption du  $\beta$ -carotène (précurseur de la vitamine A), son clivage en rétinol et la mise en réserve hépatique de la vitamine A (*Smith 1972; Bhat and Cama 1978*). Le complexe des protéines vectrices du rétinol et des HT, respectivement la RBP (retinol binding protein) et la TTR, permet d'envisager un autre aspect des interactions vitamine A-HT. Des données montrent que le niveau de sécrétion de la TTR est déterminant pour la concentration de RBP dans le sang et la formation du complexe TTR-RBP-rétinol (*Ingenbleek and Bernstein 1999*). De plus, des souris invalidées pour TTR présentent des taux de rétinol sérique et de RBP diminués (*van Bennekum et al. 2001*). Des travaux antérieurs menés au laboratoire ont mis en évidence une hypoactivité de la voie de signalisation de l'acide rétinoïque (diminution de l'expression des récepteurs nucléaires RAR) dans le foie de rats rendus hypothyroïdiens, ainsi qu'une modification des propriétés de liaison des RAR (*Pallet et al. 1994; Coustaut et al. 1996*). Une hypothyroïdie subclinique chez l'animal s'accompagne, dans le cerveau, d'une diminution du taux d'ARNm codant pour RAR ; cette expression est normalisée pas un traitement par l'AR (*Enderlin et al. 2004*).

L'ensemble de ces données de la littérature souligne le rôle important des hormones thyroïdiennes dans le fonctionnement du cerveau adulte. Par ailleurs, l'hypothyroïdie s'avère être un modèle d'étude intéressant afin de mieux comprendre les répercussions d'une baisse d'activité de la voie d'action des HT sur la fonctionnalité de la vitamine A. Rappelons en effet que l'hypothyroïdie entraîne une altération concomitante des voies de signalisation de la T3 et de l'AR.

## 2. Contexte et objectif de l'étude

Aujourd'hui, l'existence d'un lien entre des dysfonctionnements thyroïdiens et le développement de la MA a été largement rapportée. Même si les résultats restent controversés, un ensemble de données cohérentes plaide en faveur d'un état d'hypothyroïdie chez les patients atteints de MA (*van Boxtel et al. 2004*). L'hypothyroïdie est caractérisée par une augmentation du taux de TSH, une diminution du taux de T3 sérique et par une augmentation du taux de reverse T3 (forme inactive de la T3) dans le liquide céphalorachidien. Un profil identique a été retrouvé chez certains patients atteints de MA (*Yoshimasu et al. 1991; Ganguli et al. 1996; Sampaolo et al. 2005*). Récemment, (*O'Barr et al. 2006*) ont mis en évidence une augmentation de l'expression du gène codant pour APP, *in vivo*, chez des souris rendues hypothyroïdiennes et *in vitro* sur des neuroblastes humains ; cette modification est normalisée par un traitement par T3. Ces résultats confortent les données obtenues précédemment, *in vitro*, concernant la régulation négative du gène codant pour APP par T3 (*Belandia et al. 1998; Latasa et al. 1998; Villa et al. 2004*).

Comme nous l'avons vu précédemment, la prévalence de l'hypothyroïdie augmente avec l'âge. Des études menées au laboratoire ont mis en évidence une hypoactivité de la voie de signalisation de la T3 au cours du vieillissement comparable à celle observée en situation d'hypothyroïdie, chez l'animal et chez l'homme (*Enderlin et al. 2004; Feart et al. 2005; Feart et al. 2005; Vallortigara et al. 2008*). Les résultats, associés aux données de la littérature concernant l'implication de l'hypothyroïdie dans la genèse de la MA nous ont conduit à émettre l'hypothèse selon laquelle une hypothyroïdie pourrait, de façon similaire à une carence prolongée en vitamine A, modifier l'équilibre entre les deux voies de dégradation de l'APP. Par ailleurs, on sait que ces deux situations s'accompagnent d'une altération concomitante des voies de signalisation de la T3 et de l'AR. Des altérations du métabolisme et de la fonctionnalité des HT ont en effet été décrites en carence vitaminique A (*Ingenbleek and De Visscher 1979; Okamura et al. 1981; Ingenbleek 1983; Higuieret and Garcin 1984*). Une hypoactivité de la voie de la T3 a été mise en évidence dans le cerveau chez des animaux carencés en vitamine A (*Husson et al. 2003; Husson et al. 2004*). Notre démarche a également consisté à comparer l'activité de la voie de la T3 chez les rats carencés en vitamine A et hypothyroïdiens afin de mieux comprendre l'effet du niveau d'activité de la voie d'action des HT sur la fonctionnalité de la vitamine A dans les processus de dégradation de la protéine APP.

## 3. Méthodologie utilisée

L'hypothyroïdie a été induite, par un traitement des animaux pendant 5 semaines par du propylthiouracil (6-n-propyl-2-thiouracyl: PTU, Sigma) administré, à 0.05%, dans l'eau de boisson, associé à un régime standard (*Coustaut et al. 1996*). Le PTU, antithyroïdien, a la propriété d'inhiber de manière compétitive la désiodation périphérique de la T4, précurseur de la T3, assurée par la désiodase de type 1 (D1) (*Leclere et al. 1992; Lucarelli et al. 1995; Bianco et al. 2002*). Sachant que la T3 circulante est majoritairement produite par la désiodation de la T4 par la D1 au niveau du foie, le PTU induit chez le rat une forte inhibition (50%) de la production de T3. A la fin du traitement, les animaux ont été sacrifiés

par décapitation. Les structures cérébrales (hippocampe et cortex) ont été rapidement prélevées et conservées à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Les méthodes utilisées sont les mêmes que celles déjà décrites pour les animaux carencés en vitamine A et présentées dans la publication n°4.

Les amorces utilisées pour APP695 et APP770-751 sont les mêmes que celles utilisées dans la publication (Husson *et al.* 2006). Celles utilisées pour les TR sont :

TR $\alpha$  : amorce amont 5'GATTCTGTACAAGGGGGCA 3', amorce aval 5'ACAACATGCATTCCGAGAAG3'

TR $\beta$  : amorce amont 5' TCCTGATGAAGGTGACGGACCTGC 3'; amorce aval : 5' TCAAAGACTTCCAAGAAGAGAGGC 3'

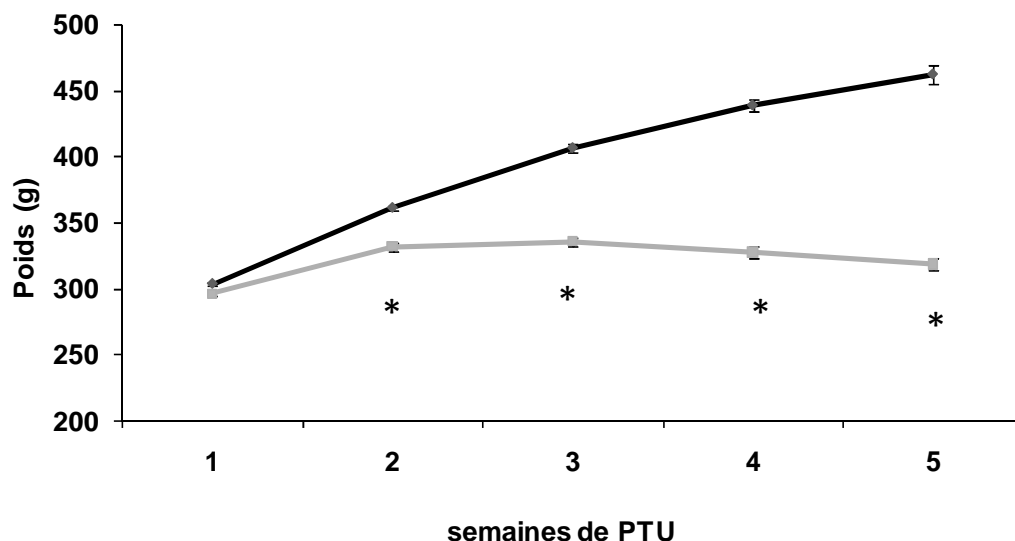
## 4. Résultats

### 4.1 Le modèle d'hypothyroïdie

L'hypothyroïdie induite par un traitement de 5 semaines par le PTU entraîne un ralentissement rapide et important de la croissance pondérale des animaux (**Figure 1**).

La différence de poids est significative entre les deux groupes dès 2 semaines de PTU (Groupe témoin :  $361.05\text{g} \pm 6.73$ ; groupe hypothyroïdie :  $331.4\text{g} \pm 12.4$ ,  $P < 0.00001$ ).

L'étude menée au laboratoire par (Coustaut *et al.* 1996) rapporte qu'un traitement identique s'accompagne d'une diminution significative de la T3 sérique ( $0,310 \pm 0.040$  chez les rats hypothyroïdiens versus  $0,580 \pm 0.030$  chez les rats témoins).



**Figure 1 :** Effet d'un traitement au PTU sur le poids corporel des rats. Chaque point correspond à la moyenne obtenue sur 16 rats ; \*  $p < 0.05$  comparativement aux rats témoins.

#### 4.2 Effet d'une hypothyroïdie sur le taux d'ARNm des récepteurs TR et RAR dans le cortex et l'hippocampe des rats

La quantification relative des ARNm des récepteurs nucléaires TR $\alpha$  et TR $\beta$  a été réalisée dans le cortex et l'hippocampe des rats (**Tableau I**). Le traitement ne modifie pas l'expression des récepteurs de la T3 dans le cortex mais une diminution significative de l'expression des deux isoformes a été observée dans l'hippocampe des rats hypothyroïdiens comparés aux rats témoins (TR $\alpha$ : -28%,  $p=0.033$  ; TR $\beta$ : -21%,  $p=0.004$ ).

Concernant l'expression de RAR $\beta$ , une diminution significative de 30% a été observée dans le cortex des rats rendus hypothyroïdiens ( $0.89 \pm 0.06$  chez les rats hypothyroïdiens versus  $1.26 \pm 0.06$  chez les rats témoins,  $p = 0.005$ ) mais aucune modification n'est observée dans l'hippocampe.

**Tableau I:** Effet de l'hypothyroïdie sur le taux d'ARNm des TR $\alpha$  et TR $\beta$  dans l'hippocampe et le cortex de rats.

	TR $\alpha$ mRNA (% PPIB)		TR $\beta$ mRNA (% PPIB)	
	Hippocampe	Cortex cérébral	Hippocampe	Cortex cérébral
<b>Témoins</b>	$2.24 \pm 0.13$	$0.89 \pm 0.05$	$2.33 \pm 0.06$	$0.97 \pm 0.04$
<b>Hypothyroïdiens</b>	$1.60 \pm 0.19^*$	$0.96 \pm 0.04$	$1.83 \pm 0.08^*$	$0.955 \pm 0.05$

Les valeurs, obtenues par RT-PCR en temps réel, correspondent à la moyenne  $\pm$  SEM obtenues sur  $n = 8$  animaux par groupe ; \* $p < 0.05$  par rapport aux rats témoins.

#### 4.3 Effet d'une hypothyroïdie sur l'expression des isoformes de l'APP dans le cortex et l'hippocampe des rats

Aucune modification significative des taux d'ARNm codant pour les protéines APP770-751 et d'APP695 n'a été observée dans le cortex des rats hypothyroïdiens par rapport aux rats témoins. En revanche, une diminution du taux d'ARNm codant pour APP695 de 34% ( $p=0.021$ ) a été mise en évidence dans l'hippocampe (**Tableau II**). Le rapport APP770-751/APP695 augmente significativement dans l'hippocampe (+60%,  $p=0.0008$ ) des rats hypothyroïdiens par rapport aux rats témoins.

**Tableau II :** Effet de l'hypothyroïdie sur le taux d'ARNm des isoformes APP695 et APP770-751 dans l'hippocampe et le cortex de rats.

	APP695 mRNA (% PPIB)		APP770-751 mRNA (% PPIB)		Rapport APP770-751/695	
	Hippocampe	Cortex	Hippocampe	Cortex	Hippocampe	Cortex
<b>Témoins</b>	2.3 ± 0.16	0.905 ± 0.06	2.55 ± 0.29	1.03 ± 0.07	1.12 ± 0.11	1.14 ± 0.05
<b>Hypothyroïdiens</b>	1.52 ± 0.10*	0.87 ± 0.04	2.70 ± 0.18	1.03 ± 0.08	1.80 ± 0.12*	1.18 ± 0.07

Les valeurs, obtenues par RT-PCR en temps réel, correspondent à la moyenne ± SEM obtenues sur n = 8 animaux par groupe ; \*p<0.05 par rapport aux rats témoins.

#### 4.4 Effet d'une hypothyroïdie sur l'expression de la protéine ADAM10 et sur l'activité $\alpha$ -sécrétase dans le cortex et l'hippocampe des rats

L'hypothyroïdie ne modifie ni l'expression d'ADAM10 (ARNm et protéines) ni l'activité enzymatique de l' $\alpha$ -sécrétase dans le cortex des animaux hypothyroïdiens comparé aux témoins. Dans l'hippocampe des animaux hypothyroïdiens, une diminution du taux d'ARNm a été observée (-24%, p=0.026) ainsi qu'une faible augmentation de 12% (p=0.009) de l'activité enzymatique de l' $\alpha$  sécrétase (**Figure 2**).

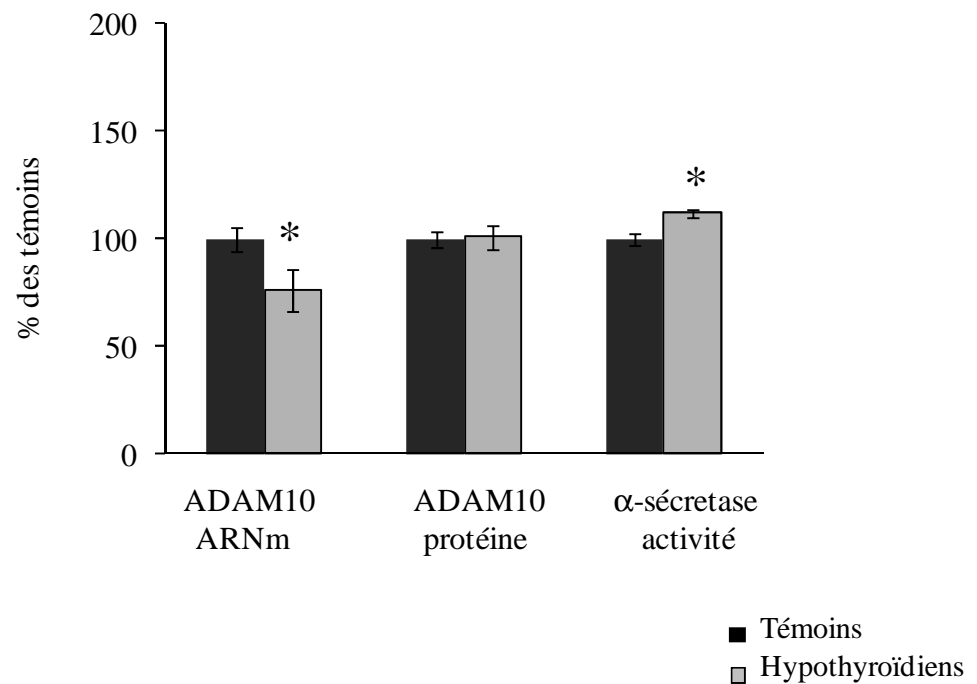
#### 4.5 Effet d'une hypothyroïdie sur l'expression des protéines BACE et PS1 ainsi que sur les activités $\beta$ - et $\gamma$ -sécrétases dans le cortex et l'hippocampe des rats

Concernant BACE, une augmentation significative du taux d'ARNm et de l'activité enzymatique a été observée (respectivement +39%, p=0.013 et +21%, p<0.0001) dans le cortex des rats hypothyroïdiens par rapport aux rats témoins. Dans l'hippocampe de ces animaux, seule une augmentation significative de l'activité  $\beta$  sécrétase (+20%, p<0.0001) a été mise en évidence. Le niveau protéique de BACE est inchangé quelque soit la structure étudiée (**Figure 3**).

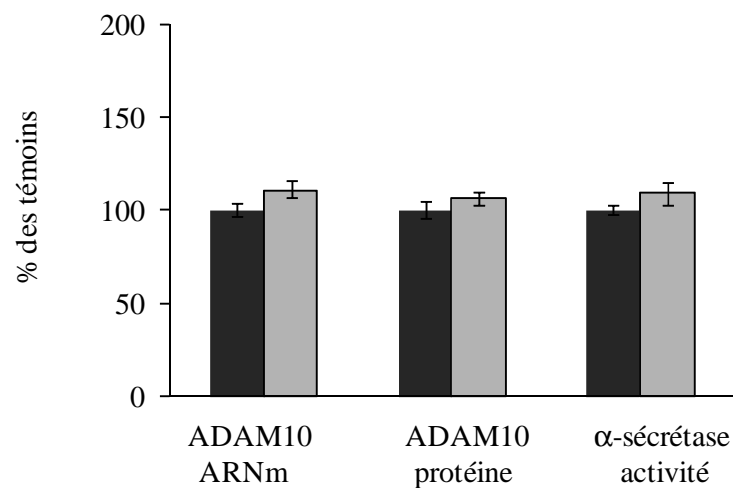
Concernant PS1, aucune modification du taux d'ARNm codant pour cette protéine n'a été observée dans le cortex ou l'hippocampe des rats hypothyroïdiens par rapport aux rats témoins. Une augmentation de son taux protéique a été observée dans l'hippocampe uniquement (+40%, p=0.006). Chez les rats hypothyroïdiens, l'activité enzymatique de la  $\gamma$ -sécrétase augmente de manière significative dans les deux structures (+24%, p<0.0001 dans le cortex et +21%, p=0.0002 dans l'hippocampe) (**Figure 4**).



(a) Hippocampe



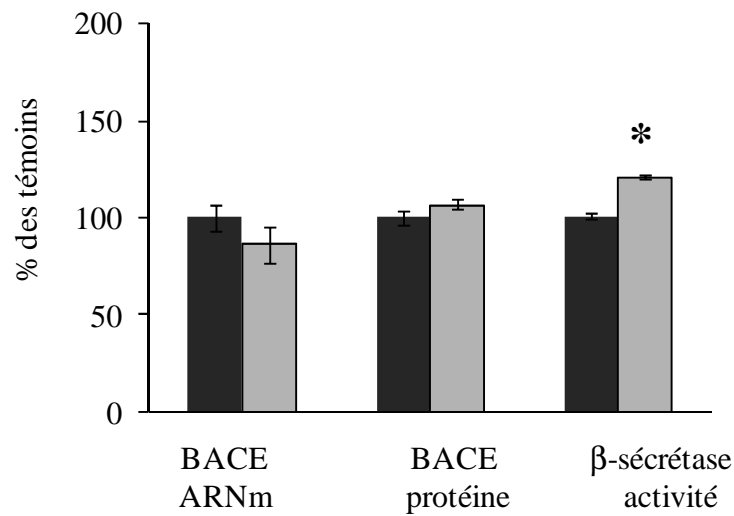
(b) Cortex



**Figure 2:** Effet de l'hypothyroïdie sur l'expression d'ADAM10 (ARNm, protéines) et l'activité enzymatique de l' $\alpha$ -sécrétase dans l'hippocampe (a) et le cortex (b) des rats.

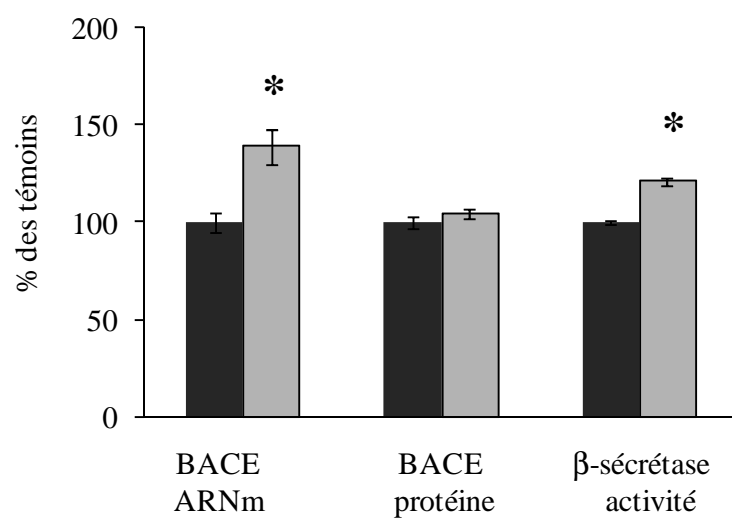
Les valeurs, obtenues respectivement par RT-PCR en temps réel, western-blot et dosage enzymatique, correspondent à la moyenne  $\pm$  SEM obtenues sur  $n = 6$  animaux par groupe ; \* $p < 0.05$  par rapport aux rats témoins.

(a) Hippocampe



■ Témoins  
 □ Hypothyroïdiens

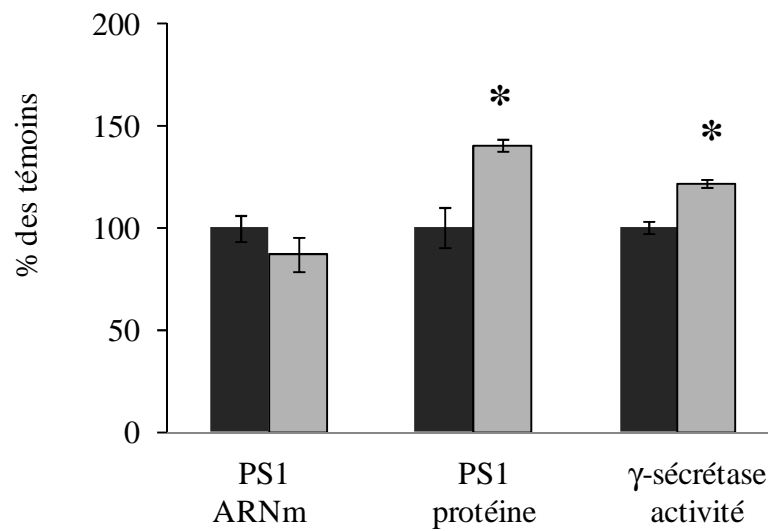
(b) Cortex



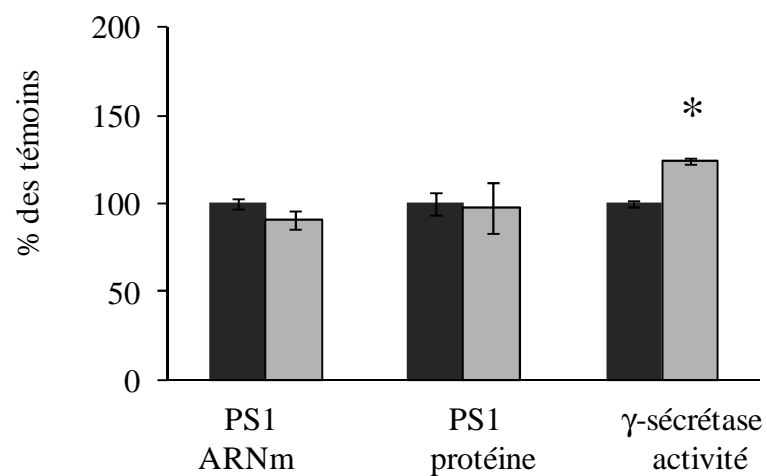
**Figure 3:** Effet de l'hypothyroïdie sur l'expression de BACE (ARNm, protéines) et l'activité enzymatique de la  $\beta$ -sécrétase dans l'hippocampe (a) et le cortex (b) des rats.

Les valeurs, obtenues respectivement par RT-PCR en temps réel, western-blot et dosage enzymatique, correspondent à la moyenne  $\pm$  SEM obtenues sur  $n = 6$  animaux par groupe ; \* $p < 0.05$  par rapport aux rats témoins.

## (a) Hippocampe



## (b) Cortex



■ Témoins  
 □ Hypothyroïdiens

**Figure 4 :** Effet de l'hypothyroïdie sur l'expression de PS1 (ARNm, protéines) et l'activité enzymatique de la  $\gamma$ -sécrétase dans l'hippocampe (a) et le cortex (b) des rats.

Les valeurs, obtenues respectivement par RT-PCR en temps réel, western-blot et par dosage enzymatique, correspondent à la moyenne  $\pm$  SEM obtenues sur  $n = 6$  animaux par groupe ; \* $p < 0.05$  par rapport aux rats témoins.

#### 4.6 Effet d'une hypothyroïdie sur le taux de peptides A $\beta$ -40 et A $\beta$ -42 dans le cortex et l'hippocampe des rats

Dans le cortex, l'hypothyroïdie s'accompagne d'une augmentation du peptide A $\beta$ 40 (+14%,  $p=0.045$ ) et d'une diminution du peptide A $\beta$ 42 (-15%,  $p=0.027$ ) (**Tableau III**). Ces modifications entraînent une diminution du rapport A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 de 26 %.

Dans l'hippocampe des rats hypothyroïdiens, ce même traitement augmente de manière significative les taux de peptides A $\beta$ 40 et A $\beta$ 42 respectivement de +18% ( $p=0.003$ ) et +51.5% ( $p<0.0001$ ) (**Tableau III**). Dans cette structure, le rapport A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 augmente de 11% ( $p=0.026$ ).

**Tableau III : Effet de l'hypothyroïdie sur le taux de peptides A $\beta$ -40 et A $\beta$ -42 dans l'hippocampe et le cortex de rats.**

	A $\beta$ 40		A $\beta$ 42	
	Hippocampe	Cortex cérébral	Hippocampe	Cortex cérébral
<b>Témoins</b>	9.81 $\pm$ 0.38	10.13 $\pm$ 0.42	0.478 $\pm$ 0.019	0.316 $\pm$ 0.011
<b>Hypothyroïdiens</b>	11.61 $\pm$ 0.34*	11.59 $\pm$ 0.64*	0.724 $\pm$ 0.041*	0.27 $\pm$ 0.015*

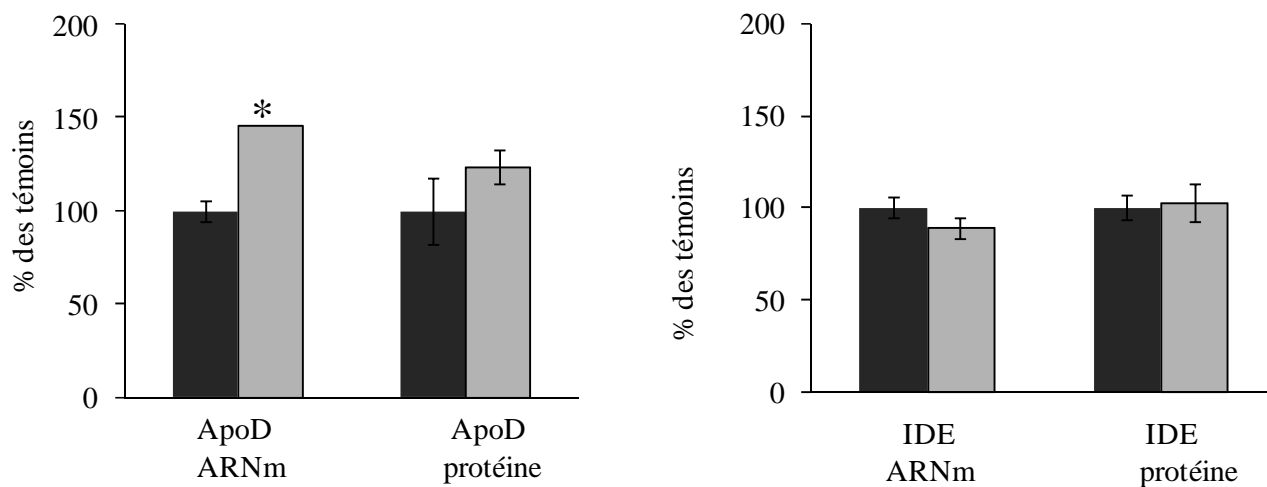
Les valeurs, obtenues par Elisa et rapportées à la quantité de protéines totales, correspondent à la moyenne  $\pm$  SEM obtenues sur  $n = 8$  animaux par groupe ; \* $p<0.05$  par rapport aux rats témoins.

#### 4.7 Effet d'une hypothyroïdie sur l'expression des protéines ApoD et IDE dans le cortex et l'hippocampe des rats

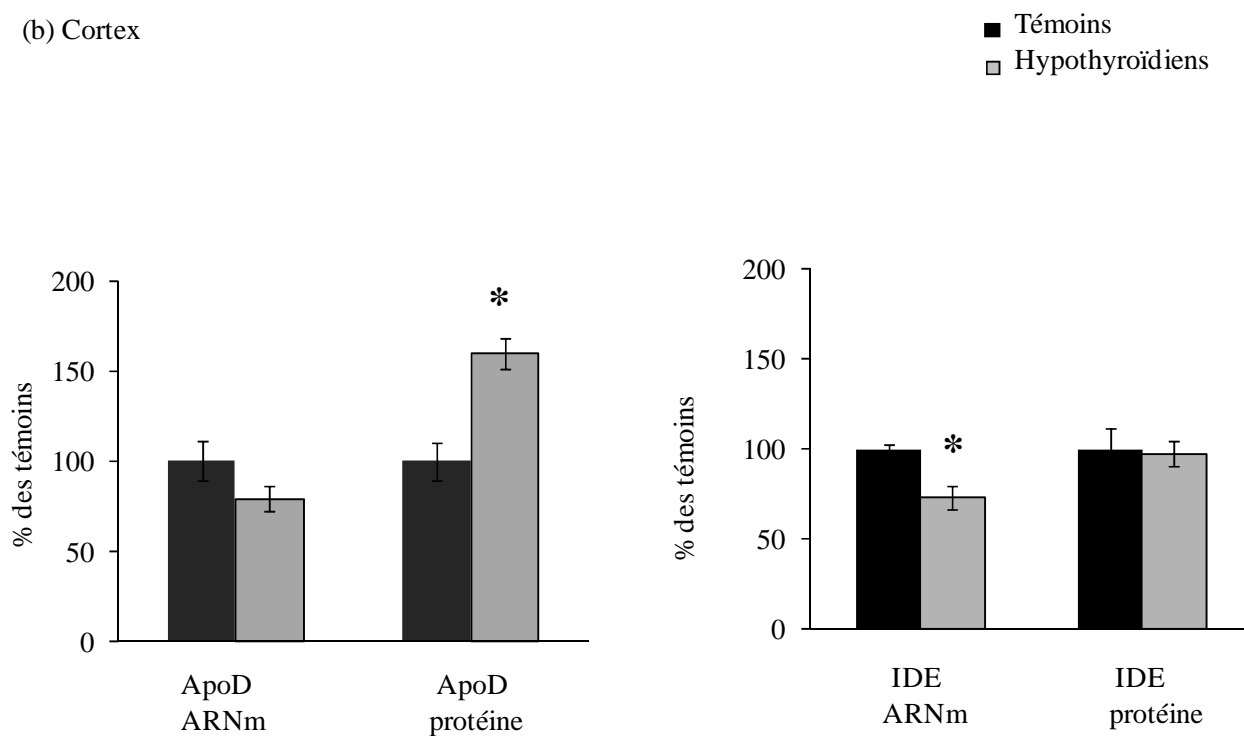
Alors que le taux d'ARNm de la protéine ApoD est diminué (-21%,  $p=0.13$ ), son taux protéique augmente de 60% ( $p=0.006$ ) dans le cortex des rats hypothyroïdiens par rapport aux rats témoins. Dans l'hippocampe des rats hypothyroïdiens, une augmentation de l'expression cette protéine a été mise en évidence (+45%,  $p=0.03$  et +24%,  $p=0.3$  respectivement pour le taux d'ARNm et de protéines) (**Figure 5**).

Concernant la protéine IDE malgré une diminution de son taux d'ARNm (-27%,  $p=0.0008$ ), aucune modification de son taux protéique a été observé dans le cortex des rats hypothyroïdiens par rapport aux rats témoins. De même, aucune modification n'a été observée dans l'hippocampe de ces rats (**Figure 5**).

(a) Hippocampe



(b) Cortex



**Figure 5:** Niveaux d'expression en ARNm et protéines d'ApoD et d'IDE dans l'hippocampe (a) et le cortex (b) de rats hypothyroïdiens obtenus respectivement par RT-PCR et Western Blot.

Les valeurs, obtenues par western-blot, correspondent à la moyenne  $\pm$  SEM obtenues sur  $n = 6$  animaux par groupe ; \* $p < 0.05$  par rapport aux rats témoins.

## 5. Discussion

Le traitement des animaux pendant 5 semaines par le PTU entraîne un ralentissement de la croissance pondérale des animaux comparable à celui décrit chez des rats thyroïdoctémisés, soit une perte de poids d'environ 35% par rapport aux témoins (*Gerges et al. 2001*). La baisse du taux de T3 sérique s'accompagne d'une diminution du taux des ARNm codant pour TR $\beta$  et, d'une manière surprenante, de ceux codant pour TR $\alpha$  dans l'hippocampe des rats. En effet, un ensemble de données de la littérature suggère que l'autorégulation des ARNm codant pour les différents TR semble dépendante des isoformes et du type cellulaire concerné (*Hodin et al. 1989; Hodin et al. 1990; Lebel et al. 1993; Sadow et al. 2003*). Dans l'hypophyse, la T3 permet une hausse de l'expression des TR $\beta_1$ , et une diminution de celle des TR $\beta_2$  et TR $\alpha_1$ . Diverses études montrent une régulation positive de l'expression de TR $\beta_1$  par la T3 dans le cerveau, ce qui rend cet isotype déterminant pour la régulation des gènes cibles en accord avec le statut thyroïdien (*Strait et al. 1990; Bernal 2005*). Ceci est confirmé par la présence chez l'homme d'un TRE dans la séquence du récepteur TR $\beta_1$  (*Suzuki et al. 1994*). On observe au contraire un effet négatif des HT sur le taux d'ARNm du récepteur TR $\alpha_1$  dans le cerveau (*Hodin et al. 1990; Constantinou et al. 2005*). La diminution de l'expression de TR $\alpha$ , qui n'a pas été observée chez les animaux carencés en vitamine A, pourrait traduire la sévérité de l'hypothyroïdie associée au traitement PTU. On sait, par ailleurs, que cette isoforme, qui est très largement exprimée dans le cerveau adulte, joue un rôle essentiel dans des fonctions importantes du cerveau adulte telles que la plasticité synaptique (*Bradley et al. 1989; Ercan-Fang et al. 1996; Vallortigara et al. 2008*).

Les conséquences de l'hypothyroïdie sur le processus de dégradation de la protéine APP sont très peu étudiées. Nos résultats suggèrent que l'hypoactivité de la voie de signalisation de la T3, due au traitement par le PTU contribuerait aux processus conduisant à la formation des plaques amyloïdes. Concernant l'expression du gène codant pour APP, seule une diminution significative du taux d'ARNm de l'APP695 a été observée dans l'hippocampe. La diminution d'APP695 est en accord avec les données de *O'Barr et al. (2006)*, auteurs qui ont cependant mis en évidence une augmentation du taux d'APP770-751. Dans nos conditions expérimentales, la régulation négative de l'expression de l'APP par T3 n'a pas été mise en évidence. En revanche, nous avons observé une augmentation du rapport APP770-751/APP695 dans l'hippocampe (+60%) des rats hypothyroïdiens, rapport considéré comme un bon indicateur de la progression de la MA (*Johnson et al. 1990; Preece et al. 2004*). Ce résultat peut être rapproché de ceux obtenus pour les indicateurs des voies de dégradation de la protéine APP qui laissent supposer que l'hypothyroïdie favoriserait la voie amyloïdogénique. En effet, quelle que soit la structure étudiée, nos résultats ne font apparaître aucune modification de l'expression d'ADAM10 et une faible augmentation de l'activité de l' $\alpha$ -sécrétase de l'ordre de 12%, en limite de significativité. La voie physiologique n'est par conséquent que peu modifiée par ce traitement. En revanche, concernant la voie amyloïdogénique, le profil d'expression de BACE et de l'activité  $\beta$ -sécrétase est similaire à celui observé par *Borghini et al. (2006)* dans le cortex de patients atteints de la MA. Dans cette structure, une augmentation de l'activité de la  $\gamma$ -sécrétase a également été observée. Cette enzyme est connue pour jouer un rôle clé dans la MA en conduisant à la formation du peptide A $\beta$  (*Shoji et al. 1992; Saido et al. 1996; Vassar 2004*). Dans l'hippocampe, une

augmentation significative de l'activité de la  $\beta$ -sécrétase a été observée, malgré une expression non modifiée de la protéine BACE. Les résultats concernant le taux d'ARNm codant pour BACE restent aujourd'hui très controversés. Certains auteurs n'ont pas mis en évidence de modification de ce dernier dans le cerveau de patients atteints de MA et développant des dépôts amyloïdes (Gatta et al. 2002; Zohar et al. 2005). Par contre, l'augmentation de l'activité  $\beta$ -sécrétase est considérée quant à elle comme la cause potentielle de l'accumulation des peptides A $\beta$  (Holsinger et al. 2002; Zohar et al. 2003; Fukumoto et al. 2004). Dans cette structure, le taux protéique de PS1 et l'activité enzymatique de la  $\gamma$ -sécrétase sont également augmentés de manière significative. Les présénilines, et particulièrement PS1, forment la partie catalytique du complexe multi-protéique de la  $\gamma$ -sécrétase (Selkoe 2001; Wolfe and Haass 2001; Laudon et al. 2007; Steiner et al. 2008; Placanica et al. 2009). Plusieurs auteurs suggèrent que l'augmentation du taux de PS1 serait responsable de la dégradation de la protéine APP selon le processus amyloïdogénique, conduisant à une accumulation de peptides A $\beta$  (Moreno-Flores et al. 1999; Xia et al. 2000; Kumar et al. 2009). L'ensemble de ces données laisse supposer que l'hypothyroïdie favorise le processus amyloïdogène de dégradation de l'APP. Ces modifications conduisent à une surproduction de peptides A $\beta$ , à l'origine des plaques séniles, dans le cortex et l'hippocampe des rats hypothyroïdiens comparativement aux rats témoins. Tandis que le cortex présente uniquement une augmentation du taux du peptide A $\beta$ -40, les formes A $\beta$ -40 et A $\beta$ -42 sont toutes deux augmentées dans l'hippocampe. Le peptide A $\beta$ 42 est considéré comme la forme d'A $\beta$  la plus neurotoxique facilitant l'aggrégation des peptides (Findeis 2007). Il apparaît alors que les modifications dans le processus de dégradation de la protéine APP, associées à l'hypothyroïdie, sont plus importantes dans l'hippocampe, structure qui est la plus vulnérable chez les patients atteints par la MA (Vickers et al. 2000; Mishizen-Eberz et al. 2004; Thal and Braak 2005). Dans cette structure, nous avons mis en évidence une augmentation du rapport A $\beta$ 42/A $\beta$ 40, reconnue dans la littérature comme un marqueur précoce de l'apparition de la MA (Findeis 2007). L'expression des protéines IDE et d'ApoD est respectivement inchangée et augmentée chez les rats hypothyroïdiens comparés aux rats témoins. ApoD colocalisée avec les plaques amyloïdes compactes dans le cortex temporal de patients atteints de la MA influencerait l'aggrégation du peptide A $\beta$  (Desai et al. 2005). Nous pouvons alors supposer que les peptides A $\beta$  ainsi formés en hypothyroïdie vont s'agréger pour former les dépôts amyloïdes à l'origine de formation des plaques séniles (Zhao et al. 2004; Desai et al. 2005; Leal et al. 2006; Miners et al. 2008; Muffat et al. 2008).

*L'hypothyroïdie dont la prévalence augmente avec l'âge apparaît donc comme un facteur exacerbant le développement de processus de type neurodégénératifs et plus précisément la dégradation de la protéine APP vers la formation de plaques amyloïdes. Une hypoactivité de la voie de l'AR, caractérisée par la diminution du taux des ARNm codant pour RAR $\beta$  (-30%) a été observée uniquement dans le cortex des animaux hypothyroïdiens. Les modifications observées dans l'hippocampe des rats hypothyroïdiens semblent par conséquent ne pas dépendre du niveau d'activité de la voie de l'AR, malgré les nombreuses interférences décrites entre les voies de signalisation de l'AR et de la T3 en situation d'hypothyroïdie. En revanche, les modifications du processus de dégradation de la protéine APP observées dans le cortex des rats carencés en vitamine A pourrait être aussi associées à l'hypoactivité de la voie de la T3, et par conséquent à une biodisponibilité réduite en T3, décrite dès 10 semaines de carence*

*(Husson et al. 2003). En effet, même si le taux d'ARNm codant pour les TRa n'est pas modifié par la carence, les aporécepteurs TRa ont la capacité de lier des TRE et modifier ainsi l'expression génique (Morte et al. 2002).*



# DISCUSSION GENERALE

Un ensemble des données cohérentes de la littérature plaide en faveur d'une relation entre une baisse d'activité de la voie de signalisation de la vitamine A, des altérations de la plasticité synaptique et des déficits mnésiques spécifiques associés au vieillissement. Une diminution de l'activité de cette voie de signalisation est également évoquée dans les processus neurodégénératifs caractéristiques de la maladie d'Alzheimer.

Dans ce contexte, les objectifs de ce travail étaient de mieux comprendre les conséquences neuro-anatomiques et fonctionnelles d'une baisse d'activité de la voie de signalisation de la vitamine A. Notre approche expérimentale a mis en œuvre 2 modèles animaux, un modèle de carence vitaminique A qui induit spécifiquement une baisse d'activité de sa voie de signalisation et un modèle d'hypothyroïdie dont il a été montré qu'il induit aussi une hypoactivité de la voie de signalisation de la vitamine A.

## 1. Rappel des principaux résultats

### 1.1 Modèle de carence vitaminique A

La démarche expérimentale conduite chez les rats carencés en vitamine A comporte deux volets : (i) un volet mettant en œuvre l'imagerie et la spectroscopie RMN, (ii) un volet moléculaire consacrée à l'étude de l'expression de gènes cibles des rétinoïdes impliqués dans le processus amyloïdogène. Les mesures ont été réalisées, d'une part, chez des animaux soumis à un régime dépourvu en vitamine A pendant 10 semaines et d'autre part, chez des animaux soumis à ce même régime pendant une durée de 13 ou 14 semaines. Une partie des animaux carencés a été traitée par de l'AR.

Dés 10 semaines de carence, les animaux présentent une altération du métabolisme et de son action cellulaire de la vitamine A qui se traduit par (i) une diminution significative du taux de vitamine A sérique, (ii) une diminution du taux d'ARNm codant pour les récepteurs RAR, dans le cerveau entier, le striatum, l'hippocampe et de manière moins prononcée le cortex des animaux. Un ralentissement de la croissance pondérale des animaux, caractéristique de l'état de carence, apparaît également à cette durée de régime.

Après 10 semaines de régime dépourvu en vitamine A, des modifications métaboliques ont été mises en évidence essentiellement dans le cortex. Elles se traduisent par une hausse du (i) NAA/Cr, marqueur de la densité neuronale corrigée par une administration d'AR, et (ii) du GSH/Cr, indicateur du potentiel antioxydant cellulaire dans cette structure.

Au plan anatomique, un ralentissement de la croissance cérébrale a été observé dès la 7<sup>ème</sup> semaine de régime. Une diminution du volume hippocampique et une augmentation des espaces ventriculaires ont été observées à partir de 11 semaines de carence. Au plan moléculaire, aucune modification de l'expression du gène codant pour APP, ou du rapport APP770-751/APP695, considéré comme un indicateur précoce de la MA n'a été observée après 10 semaines de carence.

Après 14 semaines de régime dépourvu en vitamine A, de profondes modifications métaboliques sont observées dans les trois structures à savoir le cortex, l'hippocampe et le striatum. Au plan moléculaire, une augmentation du rapport APP770-751/APP695 a été observée chez les rats soumis au régime carencé en vitamine A pendant 13 semaines. Concernant la voie amyloïdogénique, une modification du taux d'ARNm codant pour BACE a été mise en évidence. L'expression de PS1 ainsi que l'activité de la  $\gamma$ -sécrétase sont également augmentées chez les rats carencés en vitamine A pendant 14 semaines, et ceci de manière plus prononcée dans le cortex. En revanche, aucune modification notable de la voie physiologique n'a été observée chez ces animaux. Ces principaux résultats suggèrent un basculement du processus biochimique de dégradation de la protéine APP en faveur de la voie amyloïdogénique dans le cortex, et par voie de conséquence en faveur de la formation du peptide A $\beta$ . Cependant, aucune modification du taux protéique des peptides A $\beta$  n'a été mise en évidence dans le cortex et l'hippocampe des rats carencés. Dans nos conditions expérimentales, l'administration d'AR aux animaux carencés atténue les modifications résultant de la carence dans le cortex tandis qu'elle favorise le processus amyloïdogénique dans l'hippocampe. En effet, ce traitement s'accompagne d'une augmentation des peptides A $\beta$  plus prononcée dans l'hippocampe que dans le cortex, sans toutefois augmenter le rapport A $\beta$ 42/A $\beta$ 40, indicateur de la MA.

### 1.2 Modèle d'hypothyroïdie

Le modèle d'hypothyroïdie que nous avons mis en oeuvre entraîne une diminution significative du taux de T3 sérique et une altération de la croissance pondérale chez les rats traités par le PTU par rapport aux rats témoins. L'hypoactivité de la voie de signalisation de la T3, caractérisée par une diminution du taux d'ARNm codant pour TR $\alpha$  et TR $\beta$ , a été observée dans l'hippocampe des animaux. De plus, une diminution du taux d'ARNm codant pour RAR $\beta$  a également été mise en évidence dans le cortex des rats hypothyroïdiens. Au plan moléculaire, l'augmentation du rapport APP770-751/APP695 a été observée chez les rats rendus hypothyroïdiens par rapport aux rats témoins. Comme nous l'avons décrit chez les rats carencés en vitamine A, les indicateurs de la voie physiologique ne sont que très faiblement affectés chez les rats rendus hypothyroïdiens. Les modifications de la voie amyloïdogénique sont, en revanche, beaucoup plus importantes que celles observées chez les animaux carencés. Parmi elles, on peut retenir l'augmentation significative des activités de la  $\beta$ - et  $\gamma$ -sécrétase dans les deux structures étudiées, associée à l'augmentation du taux de peptides A $\beta$ .

## **4. Conséquences d'une baisse d'activité de la voie de signalisation des rétinoïdes sur les processus de type neurodégénératifs**

Un ensemble de données cohérentes de la littérature suggère l'implication d'une baisse d'activité de la voie de signalisation des rétinoïdes dans la mise en place de processus de type neurodégénératifs. Des résultats obtenus post-mortem sur des cerveaux de patients atteints de la MA tendent à confirmer que le transport et la voie d'action des rétinoïdes sont particulièrement altérés chez ces sujets et laissent supposer qu'une diminution de

biodisponibilité de l'AR favoriserait la formation de dépôts amyloïdes (Connor and Sidell 1997; Goodman 2006; Maden 2007). Par ailleurs, d'autres données montrent qu'une carence vitaminique A chez le rongeur conduit à une altération de la plasticité synaptique, de la neurogenèse hippocampique et à des déficits mnésiques (Etchamendy et al. 2001; Etchamendy et al. 2003; Bonnet et al. 2008) ainsi qu'à l'apparition de dépôts de type amyloïde dans les vaisseaux cérébraux (Corcoran et al. 2004; Lane and Bailey 2005) ; ces modifications sont également considérées comme étant des indicateurs de la MA.

Après 10 semaines de carence, on observe principalement des modifications de type métabolique caractérisées par une augmentation dans le cortex des animaux, du NAA, marqueur de l'intégrité neuronale (Moore and Galloway 2002), et du Glutathion cellulaire (GSH), principal antioxydant cellulaire (Dringen 2000; Dringen 2000). Une augmentation du taux de synthèse de NAA a été observée par Harris et al. (2006) chez certains patients atteints de la MA. Ces auteurs suggèrent la mise en place de processus adaptatifs compensatoires dans les neurones des malades afin de retarder les atteintes neuronales. De même, nous pouvons suggérer que l'augmentation de GSH pourrait être le reflet d'une réaction adaptative à une forte production radicalaire. L'augmentation du stress oxydatif jouerait en effet un rôle clé dans les phases précoces de la MA en induisant, via les processus de peroxydation cellulaire, la mort neuronale (Zhu et al. 2004; Petersen et al. 2007). Une étude menée chez des souris APP transgéniques a également montré que le stress oxydatif précède la formation de dépôts amyloïdes (Smith and Perry 1998; Pratico et al. 2001). Au plan moléculaire, aucune modification du processus de dégradation de la protéine APP n'a été observée chez les rats carencés en vitamine A pendant 10 semaines par rapport aux rats témoins (Husson et al. 2006). Au plan anatomique, un ralentissement de la croissance cérébrale a été observé dès la 7<sup>ème</sup> semaine de régime, suivi d'une diminution du volume hippocampique et d'une augmentation des espaces ventriculaires à partir de la 11<sup>ème</sup> semaine de régime. La diminution du volume hippocampique, observée chez les patients âgés non déments, progresse avec l'avancée de la maladie d'Alzheimer ; elle est d'ailleurs considérée comme un bon marqueur d'évolution de cette maladie (Enzinger et al. 2005; Gruber et al. 2008; Jagust et al. 2008). Colliot et al. (2008) ont mis en évidence une différence de volume d'environ 32% entre les patients atteints de la MA et des sujets non déments.

Des données obtenues au laboratoire ont mis en évidence que des rats soumis au même régime carencé en vitamine A présentent une diminution de l'expression de certaines protéines considérées comme des indicateurs de la plasticité synaptique (neurogranine ou RC3 et neuromodulibne ou GAP43) dans le striatum des animaux. Le striatum est une structure particulièrement sensible aux manipulations du statut vitaminique A car elle possède l'ensemble du système de métabolisation des rétinoïdes et est la plus riche en récepteurs nucléaires de l'AR (Krezel et al. 1999; Zetterstrom et al. 1999; Husson et al. 2004). Concernant la neurogenèse hippocampique, aucune modification de la prolifération ni de la différenciation cellulaire n'a été mise en évidence chez des rats soumis au même régime dépourvu de vitamine A pendant 11 semaines (Bonnet et al. 2008).

*L'ensemble de ces données met en évidence que l'hypoactivité de la voie de l'AR, générée par une carence vitaminique A d'une durée de 10 semaines n'est pas suffisante pour induire des modifications dans les mécanismes moléculaires caractéristiques du processus de*

*dégradation de la protéine APP, ni altérer la neurogenèse. Cependant, les modifications anatomiques mesurées par RMN montrent, chez les rats carencés, la mise en place d'atteintes similaires à celles précocement observées dans la MA.*

Les rats soumis à une carence prolongée de 13 ou 14 semaines présentent des atteintes métaboliques et anatomiques, mais également moléculaires et comportementales.

Après 14 semaines de régime carencé en vitamine A, les altérations de l'intégrité neuronale (diminution du NAA) sont observées dans le cortex mais aussi dans l'hippocampe et le striatum des animaux. Dans le cortex, les profils neurochimiques traduisent une activation gliale (Myoinositol) ainsi que des perturbations osmotiques (Taurine) et membranaires (Choline). La diminution du NAA et l'augmentation de la Taurine ont déjà été décrites par *Dedeoglu et al. (2004)* dans le cortex de souris transgéniques APP Tg2576. L'augmentation du MyoInositol a également été mise en évidence dans le cerveau de patients Alzheimer (*Beacher et al. 2005*). Cette activation gliale laisse supposer une activation des microglies favorable au stress oxydatif et aux mécanismes d'inflammation (*Luna-Medina et al. 2005; Sastre et al. 2006; Kampmann et al. 2008*).

Au plan moléculaire, une augmentation du rapport APP770-751/695, considéré comme un indicateur précoce de la MA, a été observé dans le cortex des rats soumis au régime carencé en vitamine A pendant 13 semaines (*Johnson et al. 1990; Preece et al. 2004; Prinzen et al. 2005*). Les taux d'ARNm codant pour ADAM10, BACE et PS1, dont la régulation positive par l'AR a été rapportée par plusieurs auteurs (*Hong et al. 1999; Satoh et al. 2000; Flood et al. 2004*), sont, pour la plupart d'entre eux, augmentés principalement dans le cortex cérébral. La carence prolongée conduit à une modification des modalités de régulation, observées *in vitro*, de l'expression des gènes cibles de l'AR. L'augmentation de l'expression de PS1 concomitante à l'augmentation de l'activité enzymatique de la  $\gamma$ -sécrétase plaide en faveur d'une dégradation de l'APP selon la voie amyloïdogénique. Dans nos conditions expérimentales, ces modifications ne s'accompagnent pas d'augmentation du taux des peptides A $\beta$ , ni dans le cortex, première structure altérée pour ce processus amyloïdogène (*Thal and Braak 2005*) ni dans l'hippocampe. Des données récentes obtenues au laboratoire ont mis en évidence une diminution de la neurogenèse hippocampique et des déficits de mémoire spatiale chez des rats soumis au même régime carencé en vitamine A pendant 14 semaines (*Bonnet et al. 2008*). Cependant, les modifications de neurogenèse associées à la MA sont aujourd'hui très controversées. Pour certains auteurs, la neurogenèse, qui assure un remodelage des réseaux neuronaux lors des processus de mémorisation dépendants de l'hippocampe (*Drapeau et al. 2007*), interviendrait pour compenser les pertes neuronales observées au cours de la maladie d'Alzheimer (*Jin et al. 2004*). Ce phénomène a été en particulier décrit chez l'homme (*Ziabreva et al. 2006*). Pour d'autres auteurs, au contraire, la maladie entraînerait une altération de ce processus associée à des déficits d'apprentissage et de mémoire (*Drapeau et al. 2003*). Des données très récentes de la littérature rapportent que l'augmentation de la neurogenèse hippocampique dépendrait de la progression de la maladie, et plus précisément de la quantité de dépôts amyloïdes (*Yu et al. 2009*). *Bonnet et al. (2008)* ont montré que les déficits de mémoire spatiale observés chez les rats soumis au régime carencé en vitamine A pendant 14 semaines sont associés à l'altération de neurogenèse hippocampique ; nous pouvons suggérer qu'à ce stade de carence, l'évolution vers les processus neurodégénératifs n'est pas

suffisante pour induire des mécanismes compensatoires tels qu'une augmentation de la neurogenèse.

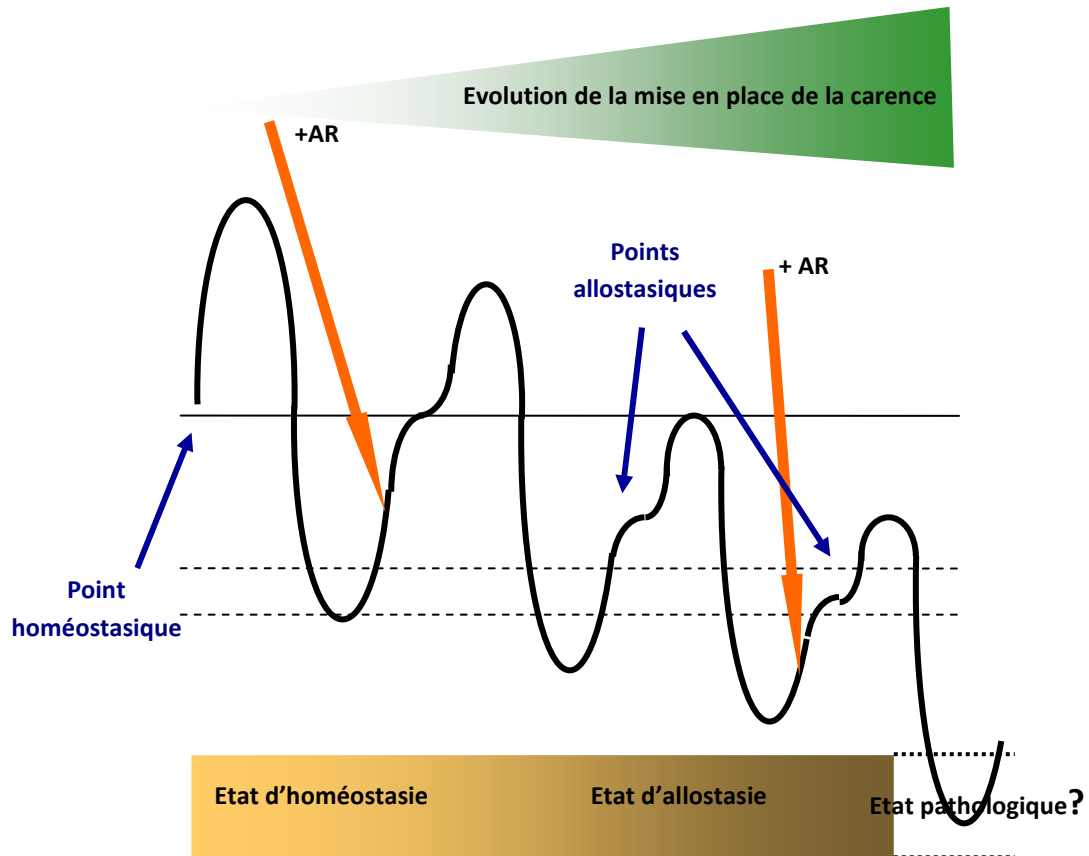
L'effet d'une administration d'AR à 14 semaines de carence semble dépendre de la structure étudiée : ce traitement (i) atténue les modifications de la voie amyloïdogénique observées dans le cortex cérébral, (ii) accentue le processus de dégradation par la voie amyloïdogénique en conduisant à une augmentation du taux de peptides A $\beta$  dans l'hippocampe sans toutefois augmenter le rapport A $\beta$ 42/A $\beta$ 40, indicateur de la MA. La régulation positive des gènes cibles de l'AR, décrite *in vitro* par de nombreux auteurs, a été mise en évidence dans cette étude, *in vivo*, dans l'hippocampe des rats traités par l'AR. L'administration d'AR aux rats carencés en vitamine A pendant 14 semaines permet de normaliser la neurogenèse et les altérations de mémoire spatiale (Bonnet et al. 2008).

*L'ensemble de ces données met en évidence que l'hypoactivité de la voie de l'AR, générée par une carence vitaminique A d'une durée de 13 à 14 semaines génère un ensemble de modifications qui peuvent être comparées à celles observées dans la maladie d'Alzheimer. Ces modifications renforcent l'idée d'une implication de l'hypoactivité de la voie de l'AR dans les processus mis en place dans cette maladie. Cependant, dans nos conditions expérimentales, le modèle de carence ne permet pas de générer une augmentation du taux de peptide A $\beta$  à l'origine de la formation des dépôts amyloïdes. Les modifications observées dans ce modèle expérimental sont plus nombreuses que celles observées après 10 semaines de régime mais restent encore des modifications qui évoquent les phases précoces de la maladie.*

L'ensemble de nos résultats montre l'évolution progressive des atteintes neurobiologiques associée à la baisse d'activité de la voie de signalisation de l'AR. Cette évolution est très nette dans notre modèle expérimental et se traduit d'abord par la mise en place d'altérations métaboliques et anatomiques (diminution du volume cérébral) puis moléculaires. Cette séquence d'évènements a été récemment observée chez des souris double transgénique pour APP/PS1 où la diminution du volume cérébral et hippocampique précède l'apparition des plaques amyloïdes (Oberg et al. 2008). Le temps semble être un paramètre très important pour la mise en place des processus neurodégénératifs et 14 semaines de régime carencé n'est probablement pas une durée suffisante pour générer les altérations les plus caractéristiques de la maladie (telle une augmentation du taux de peptides A $\beta$  à l'origine de la formation des dépôts amyloïdes). Les travaux de Corcoran et al. (2004) confortent cette idée car ces auteurs ne mettent en évidence la présence de dépôts amyloïdes dans les vaisseaux de rats carencés en vitamine A qu'après un an de régime.

Le modèle de carence (qualifié par certains auteurs de KO nutritionnel) prétend modéliser la diminution naturelle de la biodisponibilité en vitamine A liée à l'âge qui induit dans un premier temps des altérations neurobiologiques et mnésiques semblables à celles observées lors du vieillissement normal (Etchamendy et al. 2003; Husson et al. 2004), puis si la carence est poursuivie, semble faire basculer les processus vers des dysfonctionnements de types dégénératifs. Cet état intermédiaire qui précède ou fait partie des premiers stades de la pathologie est qualifié d'allostasie par certains auteurs pour le différencier de l'état homéostasique initial (Figure 13) (Koob and Le Moal 2001; Koob 2003). Dans cette situation, l'organisme doit faire varier tous les paramètres de son système physiologique en les

positionnant correctement autour d'un nouveau point de contrôle de manière à les adapter au manque chronique de vitamine A et par voie de conséquence à la biodisponibilité réduite en AR. Ceci implique que plusieurs, si ce n'est toutes les fonctions biologiques sont mobilisées (ou à l'inverse supprimées pour certaines). Si le système de contraintes auquel l'organisme est exposé se poursuit, la flexibilité des systèmes régulateurs pour maintenir la stabilité de l'organisme via l'allostasie diminue et conduit à la pathologie. Au plan théorique, il est important de souligner qu'au stade allostasique, des possibilités d'intervention persistent pour rétablir la "normalité" du système, tout ou partie, selon le stade d'avancée. Les dysfonctionnements observés chez les rats carencés en vitamine A s'apparenteraient à des stades différents de l'allostasie : après 10 semaines de régime les modifications sont principalement anatomiques tandis qu'après 14 semaines elles s'étendent au niveau métabolique et moléculaire. L'ensemble de ces modifications ne sont cependant pas suffisantes pour conduire à un état pathologique caractérisé dans la MA par la présence de plaques séniles (provenant en partie d'une agrégation des peptides A $\beta$  non augmentés chez les rats carencés par rapport aux rats témoins) et de dégénérescences neurofibrillaires non étudiés dans cette étude.



**Figure 12 :** Schéma hypothétique de l'action de l'acide rétinoïque au cours des processus adaptatifs liés à une carence en vitamine A (modifié à partir de *Koob 2003*).

## 5. Conséquences d'une hypothyroïdie sur les processus de dégradation de la protéine APP

Comme nous l'avons décrit dans le chapitre précédent, des données de la littérature ont mis en évidence une implication des HT dans les processus qui médient la plasticité synaptique (*Calza et al. 1997*) et la neurogénèse hippocampique (*Desouza et al. 2005*). L'hypothyroïdie chez le rat adulte s'accompagne de déficits mnésiques (*Dugbartey 1998; Gerges et al. 2001; Gerges and Alkadhi 2004*), de l'inhibition de la potentialisation à long terme dans la région CA1 et le gyrus dentelé de l'hippocampe (*Gilbert and Paczkowski 2003; Sui et al. 2006*), et affecte le développement des dendrites des cellules pyramidales du champ CA1 de l'hippocampe (*Gould et al. 1990*). D'autres auteurs montrent que des souris mutantes présentant des récepteurs TR $\beta$  ne liant pas la T3 ou dont le gène TR $\alpha_1$  est délété, montrent respectivement des altérations de la mémoire spatiale ou des altérations comportementales liées à des modifications structurales dans l'hippocampe (*Hashimoto et al. 2001; Guadano-Ferraz et al. 2003*).

Aujourd'hui, un ensemble de données suggère que l'hypothyroïdie, dont la prévalence augmente avec l'âge, serait un facteur de risque de la MA (*Ganguli et al. 1996; van Boxtel et al. 2004*). Pourtant, d'un point de vue moléculaire, très peu de données de la littérature existent

à ce jour. La régulation négative par T3, du gène codant pour APP, a été mise en évidence par plusieurs auteurs *in vitro* (Belandia et al. 1998; Latasa et al. 1998; Villa et al. 2004). Récemment, O'Barr et al. (2006) ont mis en évidence une augmentation de l'expression du gène codant pour APP, *in vivo*, chez des souris rendues hypothyroïdiennes et *in vitro* sur des neuroblastes humains ; cette modification est normalisée par un traitement par la T3.

Nos résultats font apparaître que l'hypothyroïdie semble modifier la nature de la régulation des gènes cibles de la T3 puisque seule une diminution de l'isoforme APP695 a été observée dans l'hippocampe des animaux. Cette diminution s'accompagne d'une augmentation du rapport APP770-751/APP695 dans l'hippocampe, qui est comparable à celle décrite par plusieurs auteurs dans l'hippocampe de sujets atteints de la MA (Johnson et al. 1990; Preece et al. 2004). Ces modifications, qui laissent supposer une modification du processus de dégradation de la protéine APP en faveur de la voie amyloïdogénique, sont cohérentes avec l'augmentation de certains indicateurs de cette voie et notamment de l'activité des  $\beta$  et  $\gamma$ -sécrétases et du peptide A $\beta$ 40 qui apparaissent dans le cortex et l'hippocampe des rats hypothyroïdiens par rapport aux rats témoins. L'augmentation du peptide A $\beta$  42, observée uniquement dans l'hippocampe, suggère une vulnérabilité prépondérante de l'hippocampe à l'hypothyroïdie. En effet, le peptide A $\beta$ 42, considéré comme la forme d'A $\beta$  la plus neurotoxique (Findeis 2007) serait déposée en premier lieu dans les plaques séniles (Iwatsubo et al. 1994). Cette forme longue A $\beta$ 42 a une capacité plus importante à s'oligomériser que la forme majoritaire A $\beta$ 40 et ainsi à former les fibrilles amyloïdes (Burdick et al. 1992; Jarrett et al. 1993). Ces oligomères d'A $\beta$ 42 ont la capacité d'altérer la plasticité synaptique dans l'hippocampe *in vivo* (Chang et al. 2006), d'inhiber la PLT (Walsh et al. 2002) et induisent une neurotoxicité *in vitro* et *in vivo* sur des neurones hippocampiques et corticaux (Walsh and Selkoe 2007). De plus, l'augmentation du ratio A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 retrouvée chez des patients atteints des formes familiales de la MA est caractérisée par des formes précoces et agressives de la maladie (Bentahir et al. 2006; Kumar-Singh et al. 2006).

Ces résultats préliminaires qui mettent en évidence une activation du processus de dégradation de la protéine APP en faveur de la voie amyloïdogénique méritent d'être complétés par l'étude d'autres indicateurs de la MA tels que la neurogénèse hippocampique ou les mécanismes de neuroinflammation. En effet, des données de la littérature rapportent une altération de la survie et de la différenciation cellulaires dans le gyrus denté de l'hippocampe de rats adultes rendus hypothyroïdiens (Desouza et al. 2005). Cependant, comme nous l'avons décrit précédemment, l'augmentation du taux de peptides A $\beta$  pourrait induire la mise en place de mécanismes compensatoires caractérisés entre autre par une augmentation de neurogénèse (Jin et al. 2004). Par ailleurs, des données de la littérature rapportent l'existence d'un lien entre le statut thyroïdien et les mécanismes de neuroinflammation. (Mendes-de-Aguiar et al. 2008) ont mis en évidence un rôle neuroprotecteur de la T3 dans la réponse inflammatoire. D'autre part, des données récentes ont montré, qu'une inflammation chronique locale s'accompagne d'une diminution des taux de T3 et T4 sériques ainsi qu'une augmentation de l'activité de la désiodase de type 3 (D3), enzyme qui inactive les HT, essentiellement localisée dans le SNC et l'hypothalamus (Boelen et al. 2005). Enfin, les HT auraient aussi un rôle dans les relations entre les neurones et les



cellules gliales qui sont d'une importance fondamentale dans l'organisation et le maintien de l'architecture du SNC, dans les phénomènes de transmission synaptique (Gomes et al. 1999).

*L'ensemble de ces données met en évidence que l'hypothyroïdie, dont la prévalence augmente avec l'âge, génère des atteintes moléculaires caractéristiques du processus de dégradation de la protéine APP, qui conduisent à une augmentation des peptides A $\beta$ , dans l'hippocampe, structure très vulnérable dans la MA. Ces données suggèrent que ce modèle physiologique d'hypothyroïdie, basé sur des modifications hormonales proches de celles observées au cours du vieillissement, pourrait générer le développement physiopathologique de certains processus participant à l'étiologie de la MA.*



## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Des données convergentes concernant le rôle de l'acide rétinoïque dans le cerveau mature, ont permis d'établir que cette molécule, qui présente un mode d'action de type hormonal, participe au maintien de la plasticité neuronale et des performances mnésiques. Cette fonctionnalité de la vitamine A dépendrait du niveau d'activité de la voie de signalisation de la T3, hormone qui joue également un rôle important dans la plasticité cérébrale et les processus mnésiques.

Les altérations de la plasticité cérébrale semblent être à la base du déclin cognitif constaté au cours du vieillissement normal et pathologique, notamment dans la MA. La prévalence de l'hypothyroïdie augmente avec l'âge, et de nombreux auteurs ont montré l'existence d'un lien entre hypothyroïdie, altération de la plasticité synaptique et déclin des performances cognitives. Par ailleurs, l'âge conduit à une moindre production d'acide rétinoïque, phénomène probablement accentué par le fait que les populations occidentales consommeraient insuffisamment de vitamine A (60% de la population a une consommation inférieure aux recommandations (*Cordain et al. 2005*). Or comme nous l'avons rapporté précédemment, la transcription de plusieurs gènes connus comme étant dérégulée chez le patient Alzheimer et dont les transcrits sont impliqués dans l'élaboration des plaques séniles, est contrôlée par l'acide rétinoïque et les hormones thyroïdiennes. Ces modifications de statuts hormonaux, liés à l'âge, s'accompagnent évidemment de différences individuelles importantes, et pourraient en partie expliquer le fait que certains sujets aient un vieillissement quasi normal tandis que d'autres développent progressivement les lésions et les troubles cognitifs décrits dans la MA.

Les objectifs de ce travail étaient de mieux comprendre certaines conséquences neuro-anatomiques et fonctionnelles d'une baisse d'activité de la voie de signalisation de la vitamine A. Un modèle de carence vitaminique A (qualifié par certains auteurs de "KO nutritionnel") qui induit spécifiquement une baisse d'activité de sa voie de signalisation, a été mis en place ainsi qu'un modèle d'hypothyroïdie dont il a été montré qu'il induit aussi une hypoactivité de la voie de signalisation de la vitamine A.

Les résultats obtenus chez les rats carencés en vitamine A laissent supposer qu'une hypoactivité de la voie d'action de la vitamine A participerait au processus de dégradation de la protéine APP sans toutefois conduire, dans le délai de l'étude, à une augmentation du taux de peptides A $\beta$ . Ces modifications moléculaires, caractéristiques de la MA, qui surviennent après les modifications métaboliques et anatomiques apparaissent essentiellement dans le cortex, structure précocement altérée dans la maladie. Des altérations de neurogenèse hippocampique et de mémoire spatiale, autres indicateurs de la MA, ont d'autre part été observées récemment au laboratoire. L'ensemble de ces modifications, dont la mise en place dépend de la durée de la carence, conforte l'hypothèse de l'existence d'un lien entre le niveau d'activité de la voie de signalisation de la vitamine A et le développement des processus neurodégénératifs. Toutefois, le modèle de carence développée dans ce travail génère des modifications qui évoquent seulement les phases

précoces de la maladie. L'étude menée chez les rats hypothyroïdiens a permis de mettre en évidence une altération plus importante du processus de dégradation de la protéine APP qui conduit à un basculement beaucoup plus net vers la voie amyloïdogénique caractérisé par une augmentation du taux de peptides A $\beta$ . Les modifications observées dans ce second modèle animal apparaissent essentiellement dans l'hippocampe, structure très vulnérable dans la MA. Ce modèle d'hypothyroïdie, induisant probablement des modifications hormonales proches de celles observées au cours du vieillissement, conduit de façon plus marquée au développement de certains processus caractéristiques de la MA que ne le fait le modèle de carence vitaminique A.

Pour poursuivre ce travail, il serait d'abord intéressant d'approfondir l'exploration menée chez les rats hypothyroïdiens. Des études anatomiques et métaboliques nous permettraient d'avoir une meilleure connaissance de la progression des atteintes associées à l'hypothyroïdie. Ces résultats pourraient alors conduire à une exploration plus poussée des lésions caractéristiques de la MA à savoir d'étudier la formation des dégénérescences neurofibrillaires. Une approche pluridisciplinaire intégrant l'étude des processus de neuroinflammation, de neurogenèse hippocampique et mnésique seraient également intéressante pour caractériser au mieux notre modèle animal.

Des études d'intervention chez l'animal hypothyroïdien dans un premier temps par l'administration d'AR ou de T3 permettraient également de mieux comprendre la part prise par chacune des voies de signalisation dans la mise en place des altérations.

Les travaux menés au laboratoire chez des personnes âgées et hypothyroïdiennes nous ont conduit à penser que le temps de mise en place de l'hypoactivité d'une voie de signalisation est un facteur déterminant pour les conséquences fonctionnelles. Une première étude a mis en évidence une baisse de l'expression des RAR $\gamma$ , TR $\alpha$ , TR $\beta$  dans les cellules mononuclées du sang de sujets âgés (69 à 90 ans) par rapport à des sujets jeunes (24-57 ans) (Feart *et al.* 2005). Des résultats comparables ont été obtenus chez des patients hypothyroïdiens (Feart *et al.* 2005). On peut suggérer que le temps est un paramètre très important pour expliquer que le vieillissement entraîne des répercussions aussi importantes sur l'expression des récepteurs nucléaires que l'ablation de la glande thyroïde elle-même. En effet, les individus hypothyroïdiens de l'étude ne sont que depuis très peu de temps sujets à une hypothyroïdie très sévère, alors que les individus âgés sont en revanche sujets à une hypothyroïdie, certes beaucoup plus légère, mais dont l'installation s'est probablement faite progressivement au cours des années et vis-à-vis de laquelle leur organisme a mis en place des stratégies d'adaptation. La perspective de développer un modèle animal associant vieillissement et carence ou vieillissement et hypothyroïdie (modèles de vieillissement où on accentue l'hypoactivité de la voie de signalisation de l'AR ou de la T3) semble aujourd'hui être également une voie de recherche intéressante.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

### A

- Abbott, R. D., L. R. White, G. W. Ross, et al. (2004). "Walking and dementia in physically capable elderly men." Jama **292**(12): 1447-53.
- Abraham, R., A. Myers, F. Wavrant-DeVrieze, et al. (2001). "Substantial linkage disequilibrium across the insulin-degrading enzyme locus but no association with late-onset Alzheimer's disease." Hum Genet **109**(6): 646-52.
- AFSSA (2001). "Apports nutritionnels conseillés pour la population française." Editions TEC & DOC 3ième édition.
- Ahlemeyer, B. and J. Kriegstein (2000). "Inhibition of glutathione depletion by retinoic acid and tocopherol protects cultured neurons from staurosporine-induced oxidative stress and apoptosis." Neurochem Int **36**(1): 1-5.
- Ait-Ghezala, G., L. Abdullah, R. Crescentini, et al. (2002). "Confirmation of association between D10S583 and Alzheimer's disease in a case--control sample." Neurosci Lett **325**(2): 87-90.
- Akasofu, S., M. Kimura, T. Kosasa, et al. (2008). "Study of neuroprotection of donepezil, a therapy for Alzheimer's disease." Chem Biol Interact **175**(1-3): 222-6.
- Alafuzoff, I., L. Aho, S. Helisalimi, et al. (2009). "Beta-amyloid deposition in brains of subjects with diabetes." Neuropathol Appl Neurobiol **35**(1): 60-8.
- Alafuzoff, I., T. Arzberger, S. Al-Sarraj, et al. (2008). "Staging of neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease: a study of the BrainNet Europe Consortium." Brain Pathol **18**(4): 484-96.
- Alafuzoff, I., D. R. Thal, T. Arzberger, et al. (2009). "Assessment of beta-amyloid deposits in human brain: a study of the BrainNet Europe Consortium." Acta Neuropathol **117**(3): 309-20.
- Allinson, T. M., E. T. Parkin, A. J. Turner, et al. (2003). "ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases." J Neurosci Res **74**(3): 342-52.
- Alperovitch, A., P. Amouyel, J. F. Dartigues, et al. (2002). "[Epidemiological studies on aging in France: from the PAQUID study to the Three-City study]." C R Biol **325**(6): 665-72.
- Altieri, M., V. Di Piero, M. Pasquini, et al. (2004). "Delayed poststroke dementia: a 4-year follow-up study." Neurology **62**(12): 2193-7.
- Altucci, L. and H. Gronemeyer (2001). "Nuclear receptors in cell life and death." Trends Endocrinol Metab **12**(10): 460-8.
- Altucci, L. and H. Gronemeyer (2001). "The promise of retinoids to fight against cancer." Nat Rev Cancer **1**(3): 181-93.
- Alzheimer, A. (1906). "Über einen eigenartigen schweren Erkrankungsprozess der Hirnrinde." Neurologisches Zentralblatt **23**: 1129-1136.
- alzheimer, a. f. (mai 2006). Le livre vert de la maladie d'Alzheimer: etats des lieux et perspectives. paris.
- Ambrogini, P., R. Cuppini, C. Cuppini, et al. (2000). "Spatial learning affects immature granule cell survival in adult rat dentate gyrus." Neurosci Lett **286**(1): 21-4.
- Ambrogini, P., R. Cuppini, P. Ferri, et al. (2005). "Thyroid hormones affect neurogenesis in the dentate gyrus of adult rat." Neuroendocrinology **81**(4): 244-53.
- Ambrogini, P., L. Orsini, C. Mancini, et al. (2004). "Learning may reduce neurogenesis in adult rat dentate gyrus." Neurosci Lett **359**(1-2): 13-6.

- Anderson, K. D., J. Sengupta, M. Morin, et al. (2001). "Overexpression of HuD accelerates neurite outgrowth and increases GAP-43 mRNA expression in cortical neurons and retinoic acid-induced embryonic stem cells in vitro." *Exp Neurol* **168**(2): 250-8.
- Arendt, T. (2004). "Neurodegeneration and plasticity." *Int J Dev Neurosci* **22**(7): 507-14.
- Arnold, S. E., B. T. Hyman, J. Flory, et al. (1991). "The topographical and neuroanatomical distribution of neurofibrillary tangles and neuritic plaques in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease." *Cereb Cortex* **1**(1): 103-16.
- Ashton, A. C. and J. O. Dolly (1997). "Microtubules and microfilaments participate in the inhibition of synaptosomal noradrenaline release by tetanus toxin." *J Neurochem* **68**(2): 649-58.
- Asson-Batres, M. A., M. S. Zeng, V. Savchenko, et al. (2003). "Vitamin A deficiency leads to increased cell proliferation in olfactory epithelium of mature rats." *J Neurobiol* **54**(4): 539-54.
- Aust, O., H. Sies, W. Stahl, et al. (2001). "Analysis of lipophilic antioxidants in human serum and tissues: tocopherols and carotenoids." *J Chromatogr A* **936**(1-2): 83-93.
- Azais-Braesco, V., I. Dodeman, S. Delpal, et al. (1995). "Vitamin A contained in the lipid droplets of rat liver stellate cells is substrate for acid retinyl ester hydrolase." *Biochim Biophys Acta* **1259**(3): 271-6.
- Azais-Braesco, V., C. Moriniere, B. Guesne, et al. (1995). "Vitamin A status in the institutionalized elderly. Critical analysis of four evaluation criteria: dietary vitamin A intake, serum retinol, relative dose-response test (RDR) and impression cytology with transfer (ICT)." *Int J Vitam Nutr Res* **65**(3): 151-61.

<b>B</b>
----------

- Bachschnid, M., B. van der Loo, K. Schuler, et al. (2004). "Oxidative stress-associated vascular aging is independent of the protein kinase C/NAD(P)H oxidase pathway." *Arch Gerontol Geriatr* **38**(2): 181-90.
- Bain, G., T. P. Ramkumar, J. M. Cheng, et al. (1993). "Expression of the genes coding for glutamic acid decarboxylase in pluripotent cell lines." *Brain Res Mol Brain Res* **17**(1-2): 23-30.
- Balmer, J. E. and R. Blomhoff (2002). "Gene expression regulation by retinoic acid." *J Lipid Res* **43**(11): 1773-808.
- Barberger-Gateau, P., L. Letenneur, V. Deschamps, et al. (2002). "Fish, meat, and risk of dementia: cohort study." *Bmj* **325**(7370): 932-3.
- Bartus, R. T. (2000). "On neurodegenerative diseases, models, and treatment strategies: lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis." *Exp Neurol* **163**(2): 495-529.
- Bastien, J. and C. Rochette-Egly (2004). "Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes." *Gene* **328**: 1-16.
- Bauer, M., E. D. London, D. H. Silverman, et al. (2003). "Thyroid, brain and mood modulation in affective disorder: insights from molecular research and functional brain imaging." *Pharmacopsychiatry* **36 Suppl 3**: S215-21.
- Beacher, F., A. Simmons, E. Daly, et al. (2005). "Hippocampal myo-inositol and cognitive ability in adults with Down syndrome: an in vivo proton magnetic resonance spectroscopy study." *Arch Gen Psychiatry* **62**(12): 1360-5.
- Beemster, P., P. Groenen and R. Steegers-Theunissen (2002). "Involvement of inositol in reproduction." *Nutr Rev* **60**(3): 80-7.
- Belandia, B., M. J. Latasa, A. Villa, et al. (1998). "Thyroid hormone negatively regulates the transcriptional activity of the beta-amyloid precursor protein gene." *J Biol Chem* **273**(46): 30366-71.

- Bell, K. F., L. Zheng, F. Fahrenholz, et al. (2008). "ADAM-10 over-expression increases cortical synaptogenesis." *Neurobiol Aging* **29**(4): 554-65.
- Bellovino, D., M. Apreda, S. Gragnoli, et al. (2003). "Vitamin A transport: in vitro models for the study of RBP secretion." *Mol Aspects Med* **24**(6): 411-20.
- Benjannet, S., A. Elagoz, L. Wickham, et al. (2001). "Post-translational processing of beta-secretase (beta-amyloid-converting enzyme) and its ectodomain shedding. The pro- and transmembrane/cytosolic domains affect its cellular activity and amyloid-beta production." *J Biol Chem* **276**(14): 10879-87.
- Bennett, M. R. (2000). "The concept of long term potentiation of transmission at synapses." *Prog Neurobiol* **60**(2): 109-37.
- Benowitz, L. I. and A. Routtenberg (1997). "GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity." *Trends Neurosci* **20**(2): 84-91.
- Bentahir, M., O. Nyabi, J. Verhamme, et al. (2006). "Presenilin clinical mutations can affect gamma-secretase activity by different mechanisms." *J Neurochem* **96**(3): 732-42.
- Bernal, J. (2005). "Thyroid hormones and brain development." *Vitam Horm* **71**: 95-122.
- Bernal, J. (2007). "Thyroid hormone receptors in brain development and function." *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* **3**(3): 249-59.
- Bernbaum, M., S. G. Albert, S. Brusca, et al. (1993). "Effectiveness of glucose monitoring systems modified for the visually impaired." *Diabetes Care* **16**(10): 1363-6.
- Bershad, S. V. (2001). "The modern age of acne therapy: a review of current treatment options." *Mt Sinai J Med* **68**(4-5): 279-86.
- Bertoni-Freddari, C., P. Fattoretti, T. Casoli, et al. (2001). "Mapping of mitochondrial metabolic competence by cytochrome oxidase and succinic dehydrogenase cytochemistry." *J Histochem Cytochem* **49**(9): 1191-2.
- Bertoni-Freddari, C., P. Fattoretti, T. Casoli, et al. (2001). "Quantitative cytochemical mapping of mitochondrial enzymes in rat cerebella." *Micron* **32**(4): 405-10.
- Bertram, L., D. Blacker, K. Mullin, et al. (2000). "Evidence for genetic linkage of Alzheimer's disease to chromosome 10q." *Science* **290**(5500): 2302-3.
- Bhat, M. K. and H. R. Cama (1978). "Thyroidal control of hepatic release and metabolism of vitamin A." *Biochim Biophys Acta* **541**(2): 211-22.
- Bianco, A. C., D. Salvatore, B. Gereben, et al. (2002). "Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases." *Endocr Rev* **23**(1): 38-89.
- Bierer, L. M., P. R. Hof, D. P. Purohit, et al. (1995). "Neocortical neurofibrillary tangles correlate with dementia severity in Alzheimer's disease." *Arch Neurol* **52**(1): 81-8.
- Bizon, J. L. and M. Gallagher (2003). "Production of new cells in the rat dentate gyrus over the lifespan: relation to cognitive decline." *Eur J Neurosci* **18**(1): 215-9.
- Bizon, J. L. and M. Gallagher (2005). "More is less: neurogenesis and age-related cognitive decline in Long-Evans rats." *Sci Aging Knowledge Environ* **2005**(7): re2.
- Bizon, J. L., J. S. Han, C. Hudon, et al. (2003). "Effects of hippocampal cholinergic deafferentation on learning strategy selection in a visible platform version of the water maze." *Hippocampus* **13**(6): 676-84.
- Bizon, J. L., H. J. Lee and M. Gallagher (2004). "Neurogenesis in a rat model of age-related cognitive decline." *Aging Cell* **3**(4): 227-34.
- Blalock, E. M., K. C. Chen, K. Sharrow, et al. (2003). "Gene microarrays in hippocampal aging: statistical profiling identifies novel processes correlated with cognitive impairment." *J Neurosci* **23**(9): 3807-19.
- Blaner, W. S. (1994). "Retinoid (Vitamin A) metabolism and the liver." *The liver: Biol And Path, 3rd edition* **30**: 529-41.
- Blennow, K., M. J. de Leon and H. Zetterberg (2006). "Alzheimer's disease." *Lancet* **368**(9533): 387-403.



- Bliss, T. V. and G. L. Collingridge (1993). "A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus." Nature **361**(6407): 31-9.
- 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**(2): 331-56.
- Blomhoff, R. and H. K. Blomhoff (2006). "Overview of retinoid metabolism and function." J Neurobiol **66**(7): 606-30.
- Blomhoff, R., M. H. Green, J. B. Green, et al. (1991). "Vitamin A metabolism: new perspectives on absorption, transport, and storage." Physiol Rev **71**(4): 951-90.
- Blomhoff, R., H. Senoo, S. Smeland, et al. (1992). "Cellular uptake of vitamin A." J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo) Spec No: 327-30.
- Blurton-Jones, M. and F. M. Laferla (2006). "Pathways by which Abeta facilitates tau pathology." Curr Alzheimer Res **3**(5): 437-48.
- Boelen, A., J. Kwakkel, A. Alkemade, et al. (2005). "Induction of type 3 deiodinase activity in inflammatory cells of mice with chronic local inflammation." Endocrinology **146**(12): 5128-34.
- Boerwinkle, E., S. Brown, A. R. Sharrett, et al. (1994). "Apolipoprotein E polymorphism influences postprandial retinyl palmitate but not triglyceride concentrations." Am J Hum Genet **54**(2): 341-60.
- Boleda, M. D., N. Saubi, J. Farres, et al. (1993). "Physiological substrates for rat alcohol dehydrogenase classes: aldehydes of lipid peroxidation, omega-hydroxyfatty acids, and retinoids." Arch Biochem Biophys **307**(1): 85-90.
- Bondareff, W. and Y. Geinisman (1976). "Loss of synapses in the dentate gyrus of the senescent rat." Am J Anat **145**(1): 129-36.
- Bonnefoy, M., J. Draï and T. Kostka (2002). "[Antioxidants to slow aging, facts and perspectives]." Presse Med **31**(25): 1174-84.
- Bonnet, E., K. Touyarot, S. Alfos, et al. (2008). "Retinoic acid restores adult hippocampal neurogenesis and reverses spatial memory deficit in vitamin A deprived rats." PLoS ONE **3**(10): e3487.
- Borchelt, D. R., T. Ratovitski, J. van Lare, et al. (1997). "Accelerated amyloid deposition in the brains of transgenic mice coexpressing mutant presenilin 1 and amyloid precursor proteins." Neuron **19**(4): 939-45.
- Borchelt, D. R., G. Thinakaran, C. B. Eckman, et al. (1996). "Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate Abeta1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo." Neuron **17**(5): 1005-13.
- Borel, P., J. Draï, H. Faure, et al. (2005). "[Recent knowledge about intestinal absorption and cleavage of carotenoids]." Ann Biol Clin (Paris) **63**(2): 165-77.
- Borel, P., P. Grolier, Y. Boirie, et al. (1998). "Oxidative stress status and antioxidant status are apparently not related to carotenoid status in healthy subjects." J Lab Clin Med **132**(1): 61-6.
- Borel, P., P. Grolier, N. Mekki, et al. (1998). "Low and high responders to pharmacological doses of beta-carotene: proportion in the population, mechanisms involved and consequences on beta-carotene metabolism." J Lipid Res **39**(11): 2250-60.
- Borel, P., N. Mekki, Y. Boirie, et al. (1998). "Comparison of the postprandial plasma vitamin A response in young and older adults." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **53**(2): B133-40.
- Borghì, R., S. Patriarca, N. Traverso, et al. (2006). "The increased activity of BACE1 correlates with oxidative stress in Alzheimer's disease." Neurobiol Aging.
- Botto, L. D., R. S. Olney and J. D. Erickson (2004). "Vitamin supplements and the risk for congenital anomalies other than neural tube defects." Am J Med Genet C Semin Med Genet **125C**(1): 12-21.

- Boucheron, C., S. Alfos, V. Enderlin, et al. (2006). "Age-related effects of ethanol consumption on triiodothyronine and retinoic acid nuclear receptors, neurogranin and neuromodulin expression levels in mouse brain." *Neurobiol Aging* **27**(9): 1326-34.
- Bourdel-Marchasson, I., M. C. Delmas-Beauvieux, E. Peuchant, et al. (2001). "Antioxidant defences and oxidative stress markers in erythrocytes and plasma from normally nourished elderly Alzheimer patients." *Age Ageing* **30**(3): 235-41.
- Bourguet, W., M. Ruff, D. Bonnier, et al. (1995). "Purification, functional characterization, and crystallization of the ligand binding domain of the retinoid X receptor." *Protein Expr Purif* **6**(5): 604-8.
- Bourguet, W., M. Ruff, P. Chambon, et al. (1995). "Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR-alpha." *Nature* **375**(6530): 377-82.
- Braak, H., I. Alafuzoff, T. Arzberger, et al. (2006). "Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry." *Acta Neuropathol* **112**(4): 389-404.
- Braak, H. and E. Braak (1991). "Neuropathological staging of Alzheimer-related changes." *Acta Neuropathol* **82**(4): 239-59.
- Braak, H. and E. Braak (1997). "Diagnostic criteria for neuropathologic assessment of Alzheimer's disease." *Neurobiol Aging* **18**(4 Suppl): S85-8.
- Bradley, D. J., W. S. Young, 3rd and C. Weinberger (1989). "Differential expression of alpha and beta thyroid hormone receptor genes in rat brain and pituitary." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(18): 7250-4.
- Bremner, J. D. and P. McCaffery (2007). "The neurobiology of retinoic acid in affective disorders." *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*.
- Bremner, J. D. and P. McCaffery (2008). "The neurobiology of retinoic acid in affective disorders." *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **32**(2): 315-31.
- Brion, J. P., A. M. Couck, E. Passareiro, et al. (1985). "Neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease: an immunohistochemical study." *J Submicrosc Cytol* **17**(1): 89-96.
- Brouillette, J. and R. Quirion (2007). "Transthyretin: A key gene involved in the maintenance of memory capacities during aging." *Neurobiol Aging*.
- Brown, J., C. M. Cooper-Kuhn, G. Kempermann, et al. (2003). "Enriched environment and physical activity stimulate hippocampal but not olfactory bulb neurogenesis." *Eur J Neurosci* **17**(10): 2042-6.
- Brown, J. P., S. Couillard-Despres, C. M. Cooper-Kuhn, et al. (2003). "Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis." *J Comp Neurol* **467**(1): 1-10.
- Bruel-Jungerman, E., S. Davis, C. Rampon, et al. (2006). "Long-term potentiation enhances neurogenesis in the adult dentate gyrus." *J Neurosci* **26**(22): 5888-93.
- Buee, L., T. Bussiere, V. Buee-Scherrer, et al. (2000). "Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders." *Brain Res Brain Res Rev* **33**(1): 95-130.
- Buee, L., A. Delacourte, K. C. Wilhelmsen, et al. (2001). "Neuronal subpopulations and genetic background in tauopathies: a catch 22 story?" *Neurobiol Aging* **22**(1): 115-21.
- Burdick, D., B. Soreghan, M. Kwon, et al. (1992). "Assembly and aggregation properties of synthetic Alzheimer's A4/beta amyloid peptide analogs." *J Biol Chem* **267**(1): 546-54.
- Burke, S. N. and C. A. Barnes (2006). "Neural plasticity in the ageing brain." *Nat Rev Neurosci* **7**(1): 30-40.
- Burklen, T. S., U. Schlattner, R. Homayouni, et al. (2006). "The Creatine Kinase/Creatine Connection to Alzheimer's Disease: CK-Inactivation, APP-CK Complexes and Focal Creatine Deposits." *J Biomed Biotechnol* **2006**(3): 35936.
- Burmeister, L. A., M. Ganguli, H. H. Dodge, et al. (2001). "Hypothyroidism and cognition: preliminary evidence for a specific defect in memory." *Thyroid* **11**(12): 1177-85.
- Bustin, S. A., V. Benes, T. Nolan, et al. (2005). "Quantitative real-time RT-PCR--a perspective." *J Mol Endocrinol* **34**(3): 597-601.

- Buttini, M., M. Orth, S. Bellosta, et al. (1999). "Expression of human apolipoprotein E3 or E4 in the brains of Apoe<sup>-/-</sup> mice: isoform-specific effects on neurodegeneration." *J Neurosci* **19**(12): 4867-80.
- Buxbaum, J. D., K. N. Liu, Y. Luo, et al. (1998). "Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor." *J Biol Chem* **273**(43): 27765-7.

<b>C</b>
----------

- Calza, L., L. Aloe and L. Giardino (1997). "Thyroid hormone-induced plasticity in the adult rat brain." *Brain Res Bull* **44**(4): 549-57.
- Calza, L., L. Giardino and L. Aloe (1997). "Thyroid hormone regulates NGF content and p75LNGFR expression in the basal forebrain of adult rats." *Exp Neurol* **143**(2): 196-206.
- Calza, L., A. Giuliani, M. Fernandez, et al. (2003). "Neural stem cells and cholinergic neurons: regulation by immunolesion and treatment with mitogens, retinoic acid, and nerve growth factor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(12): 7325-30.
- Cameron, H. A. and E. Gould (1994). "Adult neurogenesis is regulated by adrenal steroids in the dentate gyrus." *Neuroscience* **61**(2): 203-9.
- Cameron, H. A., T. G. Hazel and R. D. McKay (1998). "Regulation of neurogenesis by growth factors and neurotransmitters." *J Neurobiol* **36**(2): 287-306.
- Cameron, H. A. and R. McKay (1998). "Stem cells and neurogenesis in the adult brain." *Curr Opin Neurobiol* **8**(5): 677-80.
- Campion, D. and D. Hannequin (2006). "[APP duplication causes autosomal dominant Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy]." *Med Sci (Paris)* **22**(5): 468-9.
- Canon, E., J. M. Cosgaya, S. Scsucova, et al. (2004). "Rapid effects of retinoic acid on CREB and ERK phosphorylation in neuronal cells." *Mol Biol Cell* **15**(12): 5583-92.
- Carson, J. A. and A. J. Turner (2002). "Beta-amyloid catabolism: roles for neprilysin (NEP) and other metalloproteinases?" *J Neurochem* **81**(1): 1-8.
- Carta, M., R. Stancampiano, E. Tronci, et al. (2006). "Vitamin A deficiency induces motor impairments and striatal cholinergic dysfunction in rats." *Neuroscience*.
- Casadesus, G., P. I. Moreira, A. Nunomura, et al. (2007). "Indices of metabolic dysfunction and oxidative stress." *Neurochem Res* **32**(4-5): 717-22.
- Casoli, T., G. Di Stefano, N. Gracciotti, et al. (2001). "Age-related effects of moderate alcohol consumption on GAP-43 levels in rat hippocampus." *Mech Ageing Dev* **122**(15): 1723-38.
- Casoli, T., G. Di Stefano, N. Gracciotti, et al. (2001). "Cellular distribution of GAP-43 mRNA in hippocampus and cerebellum of adult rat brain by in situ RT-PCR." *J Histochem Cytochem* **49**(9): 1195-6.
- Casoli, T., G. D. Stefano, P. Fattoretti, et al. (2003). "GAP-43 mRNA detection by in situ hybridization, direct and indirect in situ RT-PCR in hippocampal and cerebellar tissue sections of adult rat brain." *Micron* **34**(8): 415-22.
- Cedazo-Minguez, A., U. Hamker, V. Meske, et al. (2001). "Regulation of apolipoprotein E secretion in rat primary hippocampal astrocyte cultures." *Neuroscience* **105**(3): 651-61.
- Cellerino, A. (1996). "Expression of messenger RNA coding for the nerve growth factor receptor trkA in the hippocampus of the adult rat." *Neuroscience* **70**(3): 613-16.
- Chai, C. K. (2007). "The genetics of Alzheimer's disease." *Am J Alzheimers Dis Other Demen* **22**(1): 37-41.
- Chambon, P. (1996). "A decade of molecular biology of retinoic acid receptors." *Faseb J* **10**(9): 940-54.

- Chambon, P. (2005). "The nuclear receptor superfamily: a personal retrospect on the first two decades." *Mol Endocrinol* **19**(6): 1418-28.
- Chang, K. A., H. S. Kim, T. Y. Ha, et al. (2006). "Phosphorylation of amyloid precursor protein (APP) at Thr668 regulates the nuclear translocation of the APP intracellular domain and induces neurodegeneration." *Mol Cell Biol* **26**(11): 4327-38.
- Chao, M. V. (1992). "Neurotrophin receptors: a window into neuronal differentiation." *Neuron* **9**(4): 583-93.
- Chao, M. V. and B. L. Hempstead (1995). "p75 and Trk: a two-receptor system." *Trends Neurosci* **18**(7): 321-6.
- Chapman, P. F., G. L. White, M. W. Jones, et al. (1999). "Impaired synaptic plasticity and learning in aged amyloid precursor protein transgenic mice." *Nat Neurosci* **2**(3): 271-6.
- Chen, M., C. Achkar and L. J. Gudas (1994). "Enzymatic conversion of retinaldehyde to retinoic acid by cloned murine cytosolic and mitochondrial aldehyde dehydrogenases." *Mol Pharmacol* **46**(1): 88-96.
- Chen, T. S., J. P. Richie, Jr. and C. A. Lang (1989). "The effect of aging on glutathione and cysteine levels in different regions of the mouse brain." *Proc Soc Exp Biol Med* **190**(4): 399-402.
- Chiang, M. Y., D. Misner, G. Kempermann, et al. (1998). "An essential role for retinoid receptors RARbeta and RXRgamma in long-term potentiation and depression." *Neuron* **21**(6): 1353-61.
- Chin, W. W. and P. M. Yen (1996). "T3 or not T3--the slings and arrows of outrageous TR function." *Endocrinology* **137**(2): 387-8.
- Chishti, M. A., D. S. Yang, C. Janus, et al. (2001). "Early-onset amyloid deposition and cognitive deficits in transgenic mice expressing a double mutant form of amyloid precursor protein 695." *J Biol Chem* **276**(24): 21562-70.
- Choi, J. K., A. Dedeoglu and B. G. Jenkins (2007). "Application of MRS to mouse models of neurodegenerative illness." *NMR Biomed* **20**(3): 216-37.
- Christie, B. R. and H. A. Cameron (2006). "Neurogenesis in the adult hippocampus." *Hippocampus* **16**(3): 199-207.
- Chu, P. W., W. M. Cheung and Y. L. Kwong (2003). "Differential effects of 9-cis, 13-cis and all-trans retinoic acids on the neuronal differentiation of human neuroblastoma cells." *Neuroreport* **14**(15): 1935-9.
- Cocco, S., G. Diaz, R. Stancampiano, et al. (2002). "Vitamin A deficiency produces spatial learning and memory impairment in rats." *Neuroscience* **115**(2): 475-82.
- Colliot, O., G. Chetelat, M. Chupin, et al. (2008). "Discrimination between Alzheimer disease, mild cognitive impairment, and normal aging by using automated segmentation of the hippocampus." *Radiology* **248**(1): 194-201.
- Colom, L. V. (2006). "Septal networks: relevance to theta rhythm, epilepsy and Alzheimer's disease." *J Neurochem* **96**(3): 609-23.
- Comstock, G. W., M. S. Menkes, S. E. Schober, et al. (1988). "Serum levels of retinol, beta-carotene, and alpha-tocopherol in older adults." *Am J Epidemiol* **127**(1): 114-23.
- Conner, J. M., J. C. Lauterborn, Q. Yan, et al. (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**(7): 2295-313.
- Conner, J. M., D. Muir, S. Varon, et al. (1992). "The localization of nerve growth factor-like immunoreactivity in the adult rat basal forebrain and hippocampal formation." *J Comp Neurol* **319**(3): 454-62.
- Connor, M. J. and N. Sidell (1997). "Retinoic acid synthesis in normal and Alzheimer diseased brain and human neural cells." *Mol Chem Neuropathol* **30**(3): 239-52.

- Constantinou, C., M. Margarity and T. Valcana (2005). "Region-specific effects of hypothyroidism on the relative expression of thyroid hormone receptors in adult rat brain." *Mol Cell Biochem* **278**(1-2): 93-100.
- Cook, D. G., J. B. Leverenz, P. J. McMillan, et al. (2003). "Reduced hippocampal insulin-degrading enzyme in late-onset Alzheimer's disease is associated with the apolipoprotein E-epsilon4 allele." *Am J Pathol* **162**(1): 313-9.
- Cooper-Kuhn, C. M., J. Winkler and H. G. Kuhn (2004). "Decreased neurogenesis after cholinergic forebrain lesion in the adult rat." *J Neurosci Res* **77**(2): 155-65.
- Cooper, A. J. and B. S. Kristal (1997). "Multiple roles of glutathione in the central nervous system." *Biol Chem* **378**(8): 793-802.
- Corcoran, J. and M. Maden (1999). "Nerve growth factor acts via retinoic acid synthesis to stimulate neurite outgrowth." *Nat Neurosci* **2**(4): 307-8.
- Corcoran, J., B. Shroot, J. Pizzey, et al. (2000). "The role of retinoic acid receptors in neurite outgrowth from different populations of embryonic mouse dorsal root ganglia." *J Cell Sci* **113** (Pt 14): 2567-74.
- Corcoran, J., P. L. So, R. D. Barber, et al. (2002). "Retinoic acid receptor beta2 and neurite outgrowth in the adult mouse spinal cord in vitro." *J Cell Sci* **115**(Pt 19): 3779-86.
- Corcoran, J., P. L. So and M. Maden (2002). "Absence of retinoids can induce motoneuron disease in the adult rat and a retinoid defect is present in motoneuron disease patients." *J Cell Sci* **115**(Pt 24): 4735-41.
- Corcoran, J. P., P. L. So and M. Maden (2004). "Disruption of the retinoid signalling pathway causes a deposition of amyloid beta in the adult rat brain." *Eur J Neurosci* **20**(4): 896-902.
- Cordain, L., S. B. Eaton, A. Sebastian, et al. (2005). "Origins and evolution of the Western diet: health implications for the 21st century." *Am J Clin Nutr* **81**(2): 341-54.
- Corder, E. H., A. M. Saunders, W. J. Strittmatter, et al. (1993). "Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families." *Science* **261**(5123): 921-3.
- Costantini, C., H. Scrable and L. Puglielli (2006). "An aging pathway controls the TrkA to p75NTR receptor switch and amyloid beta-peptide generation." *Embo J* **25**(9): 1997-2006.
- Court, J., N. Ferrier, H. Griffiths, et al. (1987). "Serum creatine kinase-BB levels and cerebral cortical creatine kinase activity in senile dementia of the Alzheimer type." *J Neurol Sci* **80**(1): 111-5.
- Coustaut, M., V. Pallet, H. Garcin, et al. (1996). "The influence of dietary vitamin A on triiodothyronine, retinoic acid, and glucocorticoid receptors in liver of hypothyroid rats." *Br J Nutr* **76**(2): 295-306.
- Craft, N. E., T. B. Haitema, K. M. Garnett, et al. (2004). "Carotenoid, tocopherol, and retinol concentrations in elderly human brain." *J Nutr Health Aging* **8**(3): 156-62.
- Crandall, J., Y. Sakai, J. Zhang, et al. (2004). "13-cis-retinoic acid suppresses hippocampal cell division and hippocampal-dependent learning in mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(14): 5111-6.
- Crouch, P. J., K. Cimdins, J. A. Duce, et al. (2007). "Mitochondria in aging and Alzheimer's disease." *Rejuvenation Res* **10**(3): 349-57.
- Crouch, P. J., S. M. Harding, A. R. White, et al. (2008). "Mechanisms of A beta mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease." *Int J Biochem Cell Biol* **40**(2): 181-98.
- Crutcher, K. A. (2002). "Aging and neuronal plasticity: lessons from a model." *Auton Neurosci* **96**(1): 25-32.
- Culvenor, J. G., G. Evin, M. A. Cooney, et al. (2000). "Presenilin 2 expression in neuronal cells: induction during differentiation of embryonic carcinoma cells." *Exp Cell Res* **255**(2): 192-206.

Czeh, B., T. Michaelis, T. Watanabe, et al. (2001). "Stress-induced changes in cerebral metabolites, hippocampal volume, and cell proliferation are prevented by antidepressant treatment with tianeptine." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(22): 12796-801.

<b>D</b>
----------

D'Hooge, R. and P. P. De Deyn (2001). "Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory." *Brain Res Brain Res Rev* **36**(1): 60-90.

Dartigues, J. F., C. Helmer, B. Dubois, et al. (2002). "[Alzheimer's disease: a public health problem: yes, but a priority?]." *Rev Neurol (Paris)* **158**(3): 311-5.

Davies, H. A., A. Kelly, T. M. Dhanrajan, et al. (2003). "Synaptophysin immunogold labelling of synapses decreases in dentate gyrus of the hippocampus of aged rats." *Brain Res* **986**(1-2): 191-5.

Davies, S. E., M. Gotoh, D. A. Richards, et al. (1998). "Hypoosmolarity induces an increase of extracellular N-acetylaspartate concentration in the rat striatum." *Neurochem Res* **23**(8): 1021-5.

Dawson, H. D., Y. Yamamoto, R. Zolfaghari, et al. (2000). "Regulation of hepatic vitamin A storage in a rat model of controlled vitamin A status during aging." *J Nutr* **130**(5): 1280-6.

Dayar, A. G., A. A. Ford, K. M. Cleaver, et al. (2003). "Short-term and long-term survival of new neurons in the rat dentate gyrus." *J Comp Neurol* **460**(4): 563-72.

de Hoz, L., E. I. Moser and R. G. Morris (2005). "Spatial learning with unilateral and bilateral hippocampal networks." *Eur J Neurosci* **22**(3): 745-54.

de Leon, M. J., S. DeSanti, R. Zinkowski, et al. (2004). "MRI and CSF studies in the early diagnosis of Alzheimer's disease." *J Intern Med* **256**(3): 205-23.

de Oliveira, M. R., M. A. de Bittencourt Pasquali, R. B. Silvestrin, et al. (2007). "Vitamin A supplementation induces a prooxidative state in the striatum and impairs locomotory and exploratory activity of adult rats." *Brain Res.*

de Oliveira, M. R. and J. C. Moreira (2007). "Acute and chronic vitamin A supplementation at therapeutic doses induces oxidative stress in submitochondrial particles isolated from cerebral cortex and cerebellum of adult rats." *Toxicol Lett* **173**(3): 145-50.

de Oliveira, M. R., R. B. Silvestrin, T. Mello e Souza, et al. (2008). "Therapeutic vitamin A doses increase the levels of markers of oxidative insult in substantia nigra and decrease locomotory and exploratory activity in rats after acute and chronic supplementation." *Neurochem Res* **33**(3): 378-83.

de Oliveira, M. R., R. B. Silvestrin, E. S. T. Mello, et al. (2007). "Oxidative stress in the hippocampus, anxiety-like behavior and decreased locomotory and exploratory activity of adult rats: effects of sub acute vitamin A supplementation at therapeutic doses." *Neurotoxicology* **28**(6): 1191-9.

de Oliveira, R. B., M. A. de Bittencourt Pasquali, A. Z. Filho, et al. (2007). "Can electrons travel through actin microfilaments and generate oxidative stress in retinol treated Sertoli cell?" *Mol Cell Biochem* **301**(1-2): 33-45.

de The, H., A. Marchio, P. Tiollais, et al. (1989). "Differential expression and ligand regulation of the retinoic acid receptor alpha and beta genes." *Embo J* **8**(2): 429-33.

de The, H., M. M. Vivanco-Ruiz, P. Tiollais, et al. (1990). "Identification of a retinoic acid responsive element in the retinoic acid receptor beta gene." *Nature* **343**(6254): 177-80.

Dedeoglu, A., J. K. Choi, K. Cormier, et al. (2004). "Magnetic resonance spectroscopic analysis of Alzheimer's disease mouse brain that express mutant human APP shows altered neurochemical profile." *Brain Res* **1012**(1-2): 60-5.

- Delacourte, A. (2000). "[Natural and molecular history of Alzheimer disease]." Ann Biol Clin (Paris) **58**(3): 350-5.
- Delacourte, A. (2001). "The molecular parameters of tau pathology. Tau as a killer and a witness." Adv Exp Med Biol **487**: 5-19.
- Delacourte, A. and L. Buee (2000). "Tau pathology: a marker of neurodegenerative disorders." Curr Opin Neurol **13**(4): 371-6.
- DeMeo, M. T., S. Mobarhan and W. Van De Graaff (1991). "The hazards of hypercaloric nutritional support in respiratory disease." Nutr Rev **49**(4): 112-5.
- Desai, P. P., M. D. Ikonovic, E. E. Abrahamson, et al. (2005). "Apolipoprotein D is a component of compact but not diffuse amyloid-beta plaques in Alzheimer's disease temporal cortex." Neurobiol Dis **20**(2): 574-82.
- Desmond, D. W., T. Erkinjuntti, M. Sano, et al. (1999). "The cognitive syndrome of vascular dementia: implications for clinical trials." Alzheimer Dis Assoc Disord **13** **Suppl 3**: S21-9.
- Desouza, L. A., U. Ladiwala, S. M. Daniel, et al. (2005). "Thyroid hormone regulates hippocampal neurogenesis in the adult rat brain." Mol Cell Neurosci **29**(3): 414-26.
- Dev, S., A. J. Adler and R. B. Edwards (1993). "Adult rabbit brain synthesizes retinoic acid." Brain Res **632**(1-2): 325-8.
- Ding, Y., A. Qiao, Z. Wang, et al. (2008). "Retinoic acid attenuates beta-amyloid deposition and rescues memory deficits in an Alzheimer's disease transgenic mouse model." J Neurosci **28**(45): 11622-34.
- Dobrossy, M. D., E. Drapeau, C. Aurousseau, et al. (2003). "Differential effects of learning on neurogenesis: learning increases or decreases the number of newly born cells depending on their birth date." Mol Psychiatry **8**(12): 974-82.
- Dou, J. T., M. Chen, F. Dufour, et al. (2005). "Insulin receptor signaling in long-term memory consolidation following spatial learning." Learn Mem **12**(6): 646-55.
- Drager, U. C. (2006). "Retinoic acid signaling in the functioning brain." Sci STKE **2006**(324): pe10.
- Drager, U. C. and P. McCaffery (1997). "Retinoic acid and the development of the retina." **16**: 323-51.
- Drapeau, E., W. Mayo, C. Aurousseau, et al. (2003). "Spatial memory performances of aged rats in the water maze predict levels of hippocampal neurogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(24): 14385-90.
- Drapeau, E., M. F. Montaron, S. Aguerre, et al. (2007). "Learning-induced survival of new neurons depends on the cognitive status of aged rats." J Neurosci **27**(22): 6037-44.
- Dringen, R. (2000). "Glutathione metabolism and oxidative stress in neurodegeneration." Eur J Biochem **267**(16): 4903.
- Dringen, R. (2000). "Metabolism and functions of glutathione in brain." Prog Neurobiol **62**(6): 649-71.
- Drukarch, B., E. Schepens, J. C. Stoof, et al. (1998). "Astrocyte-enhanced neuronal survival is mediated by scavenging of extracellular reactive oxygen species." Free Radic Biol Med **25**(2): 217-20.
- Dubus, P., B. Faucheux, F. Boissiere, et al. (2000). "Expression of Trk isoforms in brain regions and in the striatum of patients with Alzheimer's disease." Exp Neurol **165**(2): 285-94.
- Duester, G. (2000). "Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function: production of visual pigment and retinoic acid." Eur J Biochem **267**(14): 4315-24.
- Duester, G., F. A. Mic and A. Molotkov (2003). "Cytosolic retinoid dehydrogenases govern ubiquitous metabolism of retinol to retinaldehyde followed by tissue-specific metabolism to retinoic acid." Chem Biol Interact **143-144**: 201-10.
- Duffau, H. (2006). "Brain plasticity: from pathophysiological mechanisms to therapeutic applications." J Clin Neurosci **13**(9): 885-97.

- Dugbartey, A. T. (1998). "Neurocognitive aspects of hypothyroidism." Arch Intern Med **158**(13): 1413-8.
- Duyckaerts, C. (2004). "Looking for the link between plaques and tangles." Neurobiol Aging **25**(6): 735-9; discussion 743-6.

## E

- Edelberg, H. K. and J. Y. Wei (1996). "The biology of Alzheimer's disease." Mech Ageing Dev **91**(2): 95-114.
- Eichenbaum, H. (1999). "The hippocampus and mechanisms of declarative memory." Behav Brain Res **103**(2): 123-33.
- Eichenbaum, H., P. Dudchenko, E. Wood, et al. (1999). "The hippocampus, memory, and place cells: is it spatial memory or a memory space?" Neuron **23**(2): 209-26.
- Enderlin, V., S. Alfos, V. Pallet, et al. (1997). "Aging decreases the abundance of retinoic acid (RAR) and triiodothyronine (TR) nuclear receptor mRNA in rat brain: effect of the administration of retinoids." FEBS Lett **412**(3): 629-32.
- Enderlin, V., D. Higuere, S. Alfos, et al. (2000). "Vitamin A deficiency decreases the expression of RARbeta and RXRbeta/gamma in adult mouse brain: effect of RA administration." Nutritional Neurosciences **3**: 173-181.
- Enderlin, V., V. Pallet, S. Alfos, et al. (1997). "Age-related decreases in mRNA for brain nuclear receptors and target genes are reversed by retinoic acid treatment." Neurosci Lett **229**(2): 125-9.
- Enderlin, V., J. Vallortigara, S. Alfos, et al. (2004). "Retinoic acid reverses the PTU related decrease in neurogranin level in mice brain." J Physiol Biochem **60**(3): 191-8.
- Endres, K., R. Postina, A. Schroeder, et al. (2005). "Shedding of the amyloid precursor protein-like protein APLP2 by disintegrin-metalloproteinases." Febs J **272**(22): 5808-20.
- Engelhart, M. J., M. I. Geerlings, A. Ruitenber, et al. (2002). "Dietary intake of antioxidants and risk of Alzheimer disease." Jama **287**(24): 3223-9.
- Enmark, E. and J. A. Gustafsson (1996). "Orphan nuclear receptors--the first eight years." Mol Endocrinol **10**(11): 1293-307.
- Enzinger, C., F. Fazekas, P. M. Matthews, et al. (2005). "Risk factors for progression of brain atrophy in aging: six-year follow-up of normal subjects." Neurology **64**(10): 1704-11.
- Episkopou, V., S. Maeda, S. Nishiguchi, et al. (1993). "Disruption of the transthyretin gene results in mice with depressed levels of plasma retinol and thyroid hormone." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(6): 2375-9.
- Ercan-Fang, S., H. L. Schwartz and J. H. Oppenheimer (1996). "Isoform-specific 3,5,3'-triiodothyronine receptor binding capacity and messenger ribonucleic acid content in rat adenohypophysis: effect of thyroidal state and comparison with extrapituitary tissues." Endocrinology **137**(8): 3228-33.
- Erickson, C. A. and C. A. Barnes (2003). "The neurobiology of memory changes in normal aging." Exp Gerontol **38**(1-2): 61-9.
- Eriksson, P. S., E. Perfilieva, T. Bjork-Eriksson, et al. (1998). "Neurogenesis in the adult human hippocampus." Nat Med **4**(11): 1313-7.
- Etchamendy, N., A. Desmedt, C. Cortes-Torrea, et al. (2003). "Hippocampal lesions and discrimination performance of mice in the radial maze: sparing or impairment depending on the representational demands of the task." Hippocampus **13**(2): 197-211.
- Etchamendy, N., V. Enderlin, A. Marighetto, et al. (2003). "Vitamin A deficiency and relational memory deficit in adult mice: relationships with changes in brain retinoid signalling." Behav Brain Res **145**(1-2): 37-49.



- Etchamendy, N., V. Enderlin, A. Marighetto, et al. (2001). "Alleviation of a selective age-related relational memory deficit in mice by pharmacologically induced normalization of brain retinoid signaling." J Neurosci **21**(16): 6423-9.
- Evans, D. A., H. H. Funkenstein, M. S. Albert, et al. (1989). "Prevalence of Alzheimer's disease in a community population of older persons. Higher than previously reported." Jama **262**(18): 2551-6.
- Evans, R. M. (2005). "The nuclear receptor superfamily: a rosetta stone for physiology." Mol Endocrinol **19**(6): 1429-38.
- Everts, H. B., J. P. Sundberg and D. E. Ong (2005). "Immunolocalization of retinoic acid biosynthesis systems in selected sites in rat." Exp Cell Res **308**(2): 309-19.

<b>F</b>
----------

- Fabrigoule, C. (2002). "Do leisure activities protect against Alzheimer's disease?" Lancet Neurol **1**(1): 11.
- Fagan, A. M., M. Watson, M. Parsadanian, et al. (2002). "Human and murine ApoE markedly alters A beta metabolism before and after plaque formation in a mouse model of Alzheimer's disease." Neurobiol Dis **9**(3): 305-18.
- Fahrenholz, F. (2007). "Alpha-secretase as a therapeutic target." Curr Alzheimer Res **4**(4): 412-7.
- Fahrenholz, F. and R. Postina (2006). "Alpha-secretase activation--an approach to Alzheimer's disease therapy." Neurodegener Dis **3**(4-5): 255-61.
- Fattoretti, P., C. Bertoni-Freddari, G. Di Stefano, et al. (2001). "Quantitative immunohistochemistry of glucose transport protein (Glut3) expression in the rat hippocampus during aging." J Histochem Cytochem **49**(5): 671-2.
- Feart, C., F. Mingaud, V. Enderlin, et al. (2005). "Differential effect of retinoic acid and triiodothyronine on the age-related hypo-expression of neurogranin in rat." Neurobiol Aging **26**(5): 729-38.
- Feart, C., V. Pallet, C. Boucheron, et al. (2005). "Aging affects the retinoic acid and the triiodothyronine nuclear receptor mRNA expression in human peripheral blood mononuclear cells." Eur J Endocrinol **152**(3): 449-58.
- Feart, C., J. Vallortigara, D. Higuieret, et al. (2005). "Decreased expression of retinoid nuclear receptor (RAR alpha and RAR gamma) mRNA determined by real-time quantitative RT-PCR in peripheral blood mononuclear cells of hypothyroid patients." J Mol Endocrinol **34**(3): 849-58.
- Fedorov, N. B., P. Pasinelli, A. B. Oestreicher, et al. (1995). "Antibodies to postsynaptic PKC substrate neurogranin prevent long-term potentiation in hippocampal CA1 neurons." Eur J Neurosci **7**(4): 819-22.
- Ferguson, S. A. and K. J. Berry (2007). "Oral Accutane (13-cis-retinoic acid) has no effects on spatial learning and memory in male and female Sprague-Dawley rats." Neurotoxicol Teratol **29**(2): 219-27.
- Ferguson, S. A., F. J. Cisneros, B. Gough, et al. (2005). "Chronic oral treatment with 13-cis-retinoic acid (isotretinoin) or all-trans-retinoic acid does not alter depression-like behaviors in rats." Toxicol Sci **87**(2): 451-9.
- Ferri, C. P., M. Prince, C. Brayne, et al. (2005). "Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study." Lancet **366**(9503): 2112-7.
- Filiberti, R., A. Giacosa and O. Brignoli (1997). "High-risk subjects for vitamin deficiency." Eur J Cancer Prev **6 Suppl 1**: S37-42.
- Filippov, V., G. Kronenberg, T. Pivneva, et al. (2003). "Subpopulation of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes." Mol Cell Neurosci **23**(3): 373-82.

- Findeis, M. A. (2007). "The role of amyloid beta peptide 42 in Alzheimer's disease." Pharmacol Ther **116**(2): 266-86.
- Fiore, M., T. Amendola, V. Triaca, et al. (2005). "Fighting in the aged male mouse increases the expression of TrkA and TrkB in the subventricular zone and in the hippocampus." Behav Brain Res **157**(2): 351-62.
- Flood, F., E. Sundstrom, E. B. Samuelsson, et al. (2004). "Presenilin expression during induced differentiation of the human neuroblastoma SH-SY5Y cell line." Neurochem Int **44**(7): 487-96.
- Forette, F., M. L. Seux, J. A. Staessen, et al. (2002). "The prevention of dementia with antihypertensive treatment: new evidence from the Systolic Hypertension in Europe (Syst-Eur) study." Arch Intern Med **162**(18): 2046-52.
- Forette, F., M. L. Seux, J. A. Staessen, et al. (1998). "Prevention of dementia in randomised double-blind placebo-controlled Systolic Hypertension in Europe (Syst-Eur) trial." Lancet **352**(9137): 1347-51.
- Forman, B. M., K. Umesono, J. Chen, et al. (1995). "Unique response pathways are established by allosteric interactions among nuclear hormone receptors." Cell **81**(4): 541-50.
- Fratiglioni, L., L. J. Launer, K. Andersen, et al. (2000). "Incidence of dementia and major subtypes in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group." Neurology **54**(11 Suppl 5): S10-5.
- Freedman, L. P. (1999). "Increasing the complexity of coactivation in nuclear receptor signaling." Cell **97**(1): 5-8.
- Freedman, L. P. (1999). "Multimeric Coactivator Complexes for Steroid/Nuclear Receptors." Trends Endocrinol Metab **10**(10): 403-407.
- Freedman, L. P. (1999). "Strategies for transcriptional activation by steroid/nuclear receptors." J Cell Biochem Suppl **32-33**: 103-9.
- Frick, K. M., M. G. Baxter, A. L. Markowska, et al. (1995). "Age-related spatial reference and working memory deficits assessed in the water maze." Neurobiol Aging **16**(2): 149-60.
- Frielingsdorf, H., D. R. Simpson, L. J. Thal, et al. (2007). "Nerve growth factor promotes survival of new neurons in the adult hippocampus." Neurobiol Dis **26**(1): 47-55.
- Fukuchi, K., S. S. Deeb, K. Kamino, et al. (1992). "Increased expression of beta-amyloid protein precursor and microtubule-associated protein tau during the differentiation of murine embryonal carcinoma cells." J Neurochem **58**(5): 1863-73.
- Fukumoto, H., D. L. Rosene, M. B. Moss, et al. (2004). "Beta-secretase activity increases with aging in human, monkey, and mouse brain." Am J Pathol **164**(2): 719-25.
- Fuller, P. J. (1991). "The steroid receptor superfamily: mechanisms of diversity." Faseb J **5**(15): 3092-9.

<b>G</b>
----------

- Gackowski, D., R. Rozalski, A. Siomek, et al. (2008). "Oxidative stress and oxidative DNA damage is characteristic for mixed Alzheimer disease/vascular dementia." J Neurol Sci **266**(1-2): 57-62.
- Gallagher, M., J. L. Bizon, E. C. Hoyt, et al. (2003). "Effects of aging on the hippocampal formation in a naturally occurring animal model of mild cognitive impairment." Exp Gerontol **38**(1-2): 71-7.
- Games, D., D. Adams, R. Alessandrini, et al. (1995). "Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein." Nature **373**(6514): 523-7.
- Ganguli, M., L. A. Burmeister, E. C. Seaberg, et al. (1996). "Association between dementia and elevated TSH: a community-based study." Biol Psychiatry **40**(8): 714-25.

- Garcia, A. D., N. B. Doan, T. Imura, et al. (2004). "GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain." *Nat Neurosci* **7**(11): 1233-41.
- Gatta, L. B., A. Albertini, R. Ravid, et al. (2002). "Levels of beta-secretase BACE and alpha-secretase ADAM10 mRNAs in Alzheimer hippocampus." *Neuroreport* **13**(16): 2031-3.
- Gatz, M., C. A. Reynolds, L. Fratiglioni, et al. (2006). "Role of genes and environments for explaining Alzheimer disease." *Arch Gen Psychiatry* **63**(2): 168-74.
- Gearhart, D. A., M. L. Middlemore and A. V. Terry (2006). "ELISA methods to measure cholinergic markers and nerve growth factor receptors in cortex, hippocampus, prefrontal cortex, and basal forebrain from rat brain." *J Neurosci Methods* **150**(2): 159-73.
- Geinisman, Y., L. de Toledo-Morrell, F. Morrell, et al. (1992). "Structural synaptic plasticity associated with the induction of long-term potentiation is preserved in the dentate gyrus of aged rats." *Hippocampus* **2**(4): 445-56.
- Gerendasy, D. D. and J. G. Sutcliffe (1997). "RC3/neurogranin, a postsynaptic calpacitin for setting the response threshold to calcium influxes." *Mol Neurobiol* **15**(2): 131-63.
- Gerges, N. Z. and K. A. Alkadhi (2004). "Hypothyroidism impairs late LTP in CA1 region but not in dentate gyrus of the intact rat hippocampus: MAPK involvement." *Hippocampus* **14**(1): 40-5.
- Gerges, N. Z., K. H. Alzoubi and K. A. Alkadhi (2005). "Role of phosphorylated CaMKII and calcineurin in the differential effect of hypothyroidism on LTP of CA1 and dentate gyrus." *Hippocampus* **15**(4): 480-90.
- Gerges, N. Z., J. L. Stringer and K. A. Alkadhi (2001). "Combination of hypothyroidism and stress abolishes early LTP in the CA1 but not dentate gyrus of hippocampus of adult rats." *Brain Res* **922**(2): 250-60.
- Germain, P., P. Chambon, G. Eichele, et al. (2006). "International Union of Pharmacology. LX. Retinoic acid receptors." *Pharmacol Rev* **58**(4): 712-25.
- Germain, P., P. Chambon, G. Eichele, et al. (2006). "International Union of Pharmacology. LXIII. Retinoid X receptors." *Pharmacol Rev* **58**(4): 760-72.
- Ghenimi Rahab N, B. M., Biran M, Pallet V, Higuere P, Gallis JL. (2009). "Vitamin A Deficiency in Rats Induces Anatomic and Metabolic Changes Comparable with Those of Neurodegenerative Disorders." *Journal of Nutrition*.
- Giardino, L., C. Bettelli and L. Calza (2000). "In vivo regulation of precursor cells in the subventricular zone of adult rat brain by thyroid hormone and retinoids." *Neurosci Lett* **295**(1-2): 17-20.
- Gieng, S. H., M. H. Green, J. B. Green, et al. (2007). "Model-based compartmental analysis indicates a reduced mobilization of hepatic vitamin A during inflammation in rats." *J Lipid Res* **48**(4): 904-13.
- Giguere, V., E. S. Ong, P. Segui, et al. (1987). "Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid." *Nature* **330**(6149): 624-9.
- Gilbert, M. E. and C. Paczkowski (2003). "Propylthiouracil (PTU)-induced hypothyroidism in the developing rat impairs synaptic transmission and plasticity in the dentate gyrus of the adult hippocampus." *Brain Res Dev Brain Res* **145**(1): 19-29.
- Gillette Guyonnet, S., G. Abellan Van Kan, S. Andrieu, et al. (2007). "IANA task force on nutrition and cognitive decline with aging." *J Nutr Health Aging* **11**(2): 132-52.
- Glass, C. K. (1994). "Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers." *Endocr Rev* **15**(3): 391-407.
- Glenner, G. G. (1989). "Amyloid beta protein and the basis for Alzheimer's disease." *Prog Clin Biol Res* **317**: 857-68.
- Glenner, G. G., C. W. Wong, V. Quaranta, et al. (1984). "The amyloid deposits in Alzheimer's disease: their nature and pathogenesis." *Appl Pathol* **2**(6): 357-69.

- Goate, A., M. C. Chartier-Harlin, M. Mullan, et al. (1991). "Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease." Nature **349**(6311): 704-6.
- Gomes, F. C., C. G. Maia, J. R. de Menezes, et al. (1999). "Cerebellar astrocytes treated by thyroid hormone modulate neuronal proliferation." Glia **25**(3): 247-55.
- Goodman, A. B. (2006). "Retinoid receptors, transporters, and metabolizers as therapeutic targets in late onset Alzheimer disease." J Cell Physiol **209**(3): 598-603.
- Goodman, A. B. and A. B. Pardee (2003). "Evidence for defective retinoid transport and function in late onset Alzheimer's disease." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(5): 2901-5.
- Goswami, U. C. and S. Choudhury (1999). "The status of retinoids in women suffering from hyper- and hypothyroidism: interrelationship between vitamin A, beta-carotene and thyroid hormones." Int J Vitam Nutr Res **69**(2): 132-5.
- Gotz, J., F. Chen, R. Barmettler, et al. (2001). "Tau filament formation in transgenic mice expressing P301L tau." J Biol Chem **276**(1): 529-34.
- Gotz, J., A. Probst, M. G. Spillantini, et al. (1995). "Somatodendritic localization and hyperphosphorylation of tau protein in transgenic mice expressing the longest human brain tau isoform." Embo J **14**(7): 1304-13.
- Gould, E., M. D. Allan and B. S. McEwen (1990). "Dendritic spine density of adult hippocampal pyramidal cells is sensitive to thyroid hormone." Brain Res **525**(2): 327-9.
- Gould, E., A. Beylin, P. Tanapat, et al. (1999). "Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation." Nat Neurosci **2**(3): 260-5.
- Gould, E., H. A. Cameron and B. S. McEwen (1994). "Blockade of NMDA receptors increases cell death and birth in the developing rat dentate gyrus." J Comp Neurol **340**(4): 551-65.
- Gould, E., A. J. Reeves, M. Fallah, et al. (1999). "Hippocampal neurogenesis in adult Old World primates." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(9): 5263-7.
- Gould, E. and P. Tanapat (1999). "Stress and hippocampal neurogenesis." Biol Psychiatry **46**(11): 1472-9.
- Gould, E., P. Tanapat, N. B. Hastings, et al. (1999). "Neurogenesis in adulthood: a possible role in learning." Trends Cogn Sci **3**(5): 186-192.
- Govindaraju, V., K. Young and A. A. Maudsley (2000). "Proton NMR chemical shifts and coupling constants for brain metabolites." NMR Biomed **13**(3): 129-53.
- Greisen, M. H., C. A. Altar, T. G. Bolwig, et al. (2005). "Increased adult hippocampal brain-derived neurotrophic factor and normal levels of neurogenesis in maternal separation rats." J Neurosci Res **79**(6): 772-8.
- Griffith, H. R., J. A. den Hollander, C. C. Stewart, et al. (2007). "Elevated brain scyllo-inositol concentrations in patients with Alzheimer's disease." NMR Biomed **20**(8): 709-16.
- Grimm, M. O., H. S. Grimm, A. J. Patzold, et al. (2005). "Regulation of cholesterol and sphingomyelin metabolism by amyloid-beta and presenilin." Nat Cell Biol **7**(11): 1118-23.
- Grodstein, F., J. H. Kang, R. J. Glynn, et al. (2007). "A randomized trial of beta carotene supplementation and cognitive function in men: the Physicians' Health Study II." Arch Intern Med **167**(20): 2184-90.
- Gross, C. G. (2000). "Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma." Nat Rev Neurosci **1**(1): 67-73.
- Gruber, S., K. Pinker, F. Riederer, et al. (2008). "Metabolic changes in the normal ageing brain: consistent findings from short and long echo time proton spectroscopy." Eur J Radiol **68**(2): 320-7.
- Grummer, M. A. and R. D. Zachman (2000). "Interaction of ethanol with retinol and retinoic acid in RAR beta and GAP-43 expression." Neurotoxicol Teratol **22**(6): 829-36.

- Guadano-Ferraz, A., R. Benavides-Piccione, C. Venero, et al. (2003). "Lack of thyroid hormone receptor alpha1 is associated with selective alterations in behavior and hippocampal circuits." *Mol Psychiatry* **8**(1): 30-8.
- Gueux, E., V. Azais-Braesco, L. Bussiere, et al. (1995). "Effect of magnesium deficiency on triacylglycerol-rich lipoprotein and tissue susceptibility to peroxidation in relation to vitamin E content." *Br J Nutr* **74**(6): 849-56.
- Guzowski, J. F., G. L. Lyford, G. D. Stevenson, et al. (2000). "Inhibition of activity-dependent arc protein expression in the rat hippocampus impairs the maintenance of long-term potentiation and the consolidation of long-term memory." *J Neurosci* **20**(11): 3993-4001.
- Guzowski, J. F., B. Setlow, E. K. Wagner, et al. (2001). "Experience-dependent gene expression in the rat hippocampus after spatial learning: a comparison of the immediate-early genes Arc, c-fos, and zif268." *J Neurosci* **21**(14): 5089-98.

<b>H</b>
----------

- Haass, C., J. Grunberg, A. Capell, et al. (1998). "Proteolytic processing of Alzheimer's disease associated proteins." *J Neural Transm Suppl* **53**: 159-67.
- Hagg, T. (2005). "Molecular regulation of adult CNS neurogenesis: an integrated view." *Trends Neurosci* **28**(11): 589-95.
- Hagglund, M., A. Berghard, J. Strotmann, et al. (2006). "Retinoic acid receptor-dependent survival of olfactory sensory neurons in postnatal and adult mice." *J Neurosci* **26**(12): 3281-91.
- Hallfrisch, J., D. C. Muller and V. N. Singh (1994). "Vitamin A and E intakes and plasma concentrations of retinol, beta-carotene, and alpha-tocopherol in men and women of the Baltimore Longitudinal Study of Aging." *Am J Clin Nutr* **60**(2): 176-82.
- Hamdane, M., A. V. Sambo, P. Delobel, et al. (2003). "Mitotic-like tau phosphorylation by p25-Cdk5 kinase complex." *J Biol Chem* **278**(36): 34026-34.
- Hansalik, M., M. Skalicky and A. Viidik (2006). "Impairment of water maze behaviour with ageing is counteracted by maze learning earlier in life but not by physical exercise, food restriction or housing conditions." *Exp Gerontol* **41**(2): 169-74.
- Harburger, L. L., T. J. Lambert and K. M. Frick (2007). "Age-dependent effects of environmental enrichment on spatial reference memory in male mice." *Behav Brain Res*.
- Hardy, J. (1997). "Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease." *Trends Neurosci* **20**(4): 154-9.
- Harris, F. M., I. Tesseur, W. J. Brecht, et al. (2004). "Astroglial regulation of apolipoprotein E expression in neuronal cells. Implications for Alzheimer's disease." *J Biol Chem* **279**(5): 3862-8.
- Harris, K., A. Lin, P. Bhattacharya, et al. (2006). "Regulation of NAA-synthesis in the human brain in vivo: Canavan's disease, Alzheimer's disease and schizophrenia." *Adv Exp Med Biol* **576**: 263-73; discussion 361-3.
- Harrison, E. H. and M. M. Hussain (2001). "Mechanisms involved in the intestinal digestion and absorption of dietary vitamin A." *J Nutr* **131**(5): 1405-8.
- Hashimoto, K., F. H. Curty, P. P. Borges, et al. (2001). "An unliganded thyroid hormone receptor causes severe neurological dysfunction." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(7): 3998-4003.
- Haskell, G. T. and A. S. LaMantia (2005). "Retinoic acid signaling identifies a distinct precursor population in the developing and adult forebrain." *J Neurosci* **25**(33): 7636-47.

- Heicklen-Klein, A., S. Aronov and I. Ginzburg (2000). "Tau promoter activity in neuronally differentiated P19 cells." Brain Res **874**(1): 1-9.
- Heine, V. M., S. Maslam, M. Joels, et al. (2004). "Prominent decline of newborn cell proliferation, differentiation, and apoptosis in the aging dentate gyrus, in absence of an age-related hypothalamus-pituitary-adrenal axis activation." Neurobiol Aging **25**(3): 361-75.
- Hellweg, R., W. Fischer, C. Hock, et al. (1990). "Nerve growth factor levels and choline acetyltransferase activity in the brain of aged rats with spatial memory impairments." Brain Res **537**(1-2): 123-30.
- Hellweg, R., C. Humpel, A. Lowe, et al. (1997). "Moderate lesion of the rat cholinergic septohippocampal pathway increases hippocampal nerve growth factor synthesis: evidence for long-term compensatory changes?" Brain Res Mol Brain Res **45**(1): 177-81.
- Helmer, C., D. Damon, L. Letenneur, et al. (1999). "Marital status and risk of Alzheimer's disease: a French population-based cohort study." Neurology **53**(9): 1953-8.
- Helmer, C., L. Letenneur, I. Rouch, et al. (2001). "Occupation during life and risk of dementia in French elderly community residents." J Neurol Neurosurg Psychiatry **71**(3): 303-9.
- Helmer, C., E. Peuchant, L. Letenneur, et al. (2003). "Association between antioxidant nutritional indicators and the incidence of dementia: results from the PAQUID prospective cohort study." Eur J Clin Nutr **57**(12): 1555-61.
- Henderson, C. E. (1996). "Role of neurotrophic factors in neuronal development." Curr Opin Neurobiol **6**(1): 64-70.
- Hendrie, H. C., A. Ogunniyi, K. S. Hall, et al. (2001). "Incidence of dementia and Alzheimer disease in 2 communities: Yoruba residing in Ibadan, Nigeria, and African Americans residing in Indianapolis, Indiana." Jama **285**(6): 739-47.
- Heneka, M. T. and M. K. O'Banion (2007). "Inflammatory processes in Alzheimer's disease." J Neuroimmunol **184**(1-2): 69-91.
- Henon, H., F. Pasquier, I. Durieu, et al. (1998). "Medial temporal lobe atrophy in stroke patients: relation to pre-existing dementia." J Neurol Neurosurg Psychiatry **65**(5): 641-7.
- Hercberg, S., P. Preziosi, P. Galan, et al. (1994). "Vitamin status of a healthy French population: dietary intakes and biochemical markers." Int J Vitam Nutr Res **64**(3): 220-32.
- Hernandez-Pinto, A. M., L. Puebla-Jimenez and E. Arilla-Ferreiro (2006). "A vitamin A-free diet results in impairment of the rat hippocampal somatostatinergic system." Neuroscience **141**(2): 851-61.
- Higueret, P. and H. Garcin (1984). "Triiodothyronine and vitamin A-deficiency in the rat." J Physiol (Paris) **79**(5): 373-7.
- Hock, C., K. Heese, C. Hulette, et al. (2000). "Region-specific neurotrophin imbalances in Alzheimer disease: decreased levels of brain-derived neurotrophic factor and increased levels of nerve growth factor in hippocampus and cortical areas." Arch Neurol **57**(6): 846-51.
- Hodges, H. (1996). "Maze procedures: the radial-arm and water maze compared." Brain Res Cogn Brain Res **3**(3-4): 167-81.
- Hodin, R. A., M. A. Lazar and W. W. Chin (1989). "The pituitary-specific form of rat c-erbA is a biologically active thyroid hormone receptor." Curr Surg **46**(4): 298-301.
- Hodin, R. A., M. A. Lazar and W. W. Chin (1990). "Differential and tissue-specific regulation of the multiple rat c-erbA messenger RNA species by thyroid hormone." J Clin Invest **85**(1): 101-5.
- Holback, S., L. Adlerz, T. Gatsinzi, et al. (2008). "PI3-K- and PKC-dependent up-regulation of APP processing enzymes by retinoic acid." Biochem Biophys Res Commun **365**(2): 298-303.

- Holback, S., L. Adlerz and K. Iverfeldt (2005). "Increased processing of APLP2 and APP with concomitant formation of APP intracellular domains in BDNF and retinoic acid-differentiated human neuroblastoma cells." J Neurochem **95**(4): 1059-68.
- Holcomb, L., M. N. Gordon, E. McGowan, et al. (1998). "Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes." Nat Med **4**(1): 97-100.
- Hollander, D. and V. Dadufalza (1990). "Influence of aging on vitamin A transport into the lymphatic circulation." Exp Gerontol **25**(1): 61-5.
- Holmes, M. M., L. A. Galea, R. E. Mistlberger, et al. (2004). "Adult hippocampal neurogenesis and voluntary running activity: circadian and dose-dependent effects." J Neurosci Res **76**(2): 216-22.
- Holsinger, R. M., C. A. McLean, K. Beyreuther, et al. (2002). "Increased expression of the amyloid precursor beta-secretase in Alzheimer's disease." Ann Neurol **51**(6): 783-6.
- Holtzman, D. M., K. R. Bales, T. Tenkova, et al. (2000). "Apolipoprotein E isoform-dependent amyloid deposition and neuritic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(6): 2892-7.
- Hong, C. S., L. Caromile, Y. Nomata, et al. (1999). "Contrasting role of presenilin-1 and presenilin-2 in neuronal differentiation in vitro." J Neurosci **19**(2): 637-43.
- Hosomi, S., T. Yamashita, M. Aoki, et al. (2003). "The p75 receptor is required for BDNF-induced differentiation of neural precursor cells." Biochem Biophys Res Commun **301**(4): 1011-5.
- Huang, E. J. and L. F. Reichardt (2001). "Neurotrophins: roles in neuronal development and function." Annu Rev Neurosci **24**: 677-736.
- Huang, F. L., K. P. Huang and C. Boucheron (2007). "Long-term enrichment enhances the cognitive behavior of the aging neurogranin null mice without affecting their hippocampal LTP." Learn Mem **14**(8): 512-9.
- Huang, K. P., F. L. Huang, T. Jager, et al. (2004). "Neurogranin/RC3 enhances long-term potentiation and learning by promoting calcium-mediated signaling." J Neurosci **24**(47): 10660-9.
- Huang, Y. (2006). "Apolipoprotein E and Alzheimer disease." Neurology **66**(2 Suppl 1): S79-85.
- Hupert, J., S. Mobarhan, T. J. Layden, et al. (1991). "In vitro formation of retinoic acid from retinal in rat liver." Biochem Cell Biol **69**(8): 509-14.
- Husson, M., V. Enderlin, S. Alfos, et al. (2004). "Expression of neurogranin and neuromodulin is affected in the striatum of vitamin A-deprived rats." Brain Res Mol Brain Res **123**(1-2): 7-17.
- Husson, M., V. Enderlin, S. Alfos, et al. (2003). "Triiodothyronine administration reverses vitamin A deficiency-related hypo-expression of retinoic acid and triiodothyronine nuclear receptors and of neurogranin in rat brain." Br J Nutr **90**(1): 191-8.
- Husson, M., V. Enderlin, A. Delacourte, et al. (2006). "Retinoic acid normalizes nuclear receptor mediated hypo-expression of proteins involved in beta-amyloid deposits in the cerebral cortex of vitamin A deprived rats." Neurobiol Dis **23**(1): 1-10.

<b>I</b>
----------

- Ingenbleek, Y. (1983). "Vitamin A-deficiency impairs the normal mannosylation, conformation and iodination of thyroglobulin: a new etiological approach to endemic goitre." Experientia Suppl **44**: 264-97.

- Ingenbleek, Y. and L. Bernstein (1999). "The stressful condition as a nutritionally dependent adaptive dichotomy." *Nutrition* **15**(4): 305-20.
- Ingenbleek, Y. and M. De Visscher (1979). "Hormonal and nutritional status: critical conditions for endemic goiter epidemiology?" *Metabolism* **28**(1): 9-19.
- Iniguez, M. A., B. Morte, A. Rodriguez-Pena, et al. (1994). "Characterization of the promoter region and flanking sequences of the neuron-specific gene RC3 (neurogranin)." *Brain Res Mol Brain Res* **27**(2): 205-14.
- Irizarry, M. C. and B. T. Hyman (2001). "Alzheimer disease therapeutics." *J Neuropathol Exp Neurol* **60**(10): 923-8.
- Irizarry, M. C., J. J. Locascio and B. T. Hyman (2001). "beta-site APP cleaving enzyme mRNA expression in APP transgenic mice: anatomical overlap with transgene expression and static levels with aging." *Am J Pathol* **158**(1): 173-7.
- Iwatsubo, T., A. Odaka, N. Suzuki, et al. (1994). "Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43)." *Neuron* **13**(1): 45-53.

<b>J</b>
----------

- Jacobs, S., D. C. Lie, K. L. Decicco, et al. (2006). "Retinoic acid is required early during adult neurogenesis in the dentate gyrus." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(10): 3902-7.
- Jagust, W. J., L. Zheng, D. J. Harvey, et al. (2008). "Neuropathological basis of magnetic resonance images in aging and dementia." *Ann Neurol* **63**(1): 72-80.
- Jamsa, A., K. Hasslund, R. F. Cowburn, et al. (2004). "The retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor differentiated SH-SY5Y cell line as a model for Alzheimer's disease-like tau phosphorylation." *Biochem Biophys Res Commun* **319**(3): 993-1000.
- Jankowsky, J. L., T. Melnikova, D. J. Fadale, et al. (2005). "Environmental enrichment mitigates cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease." *J Neurosci* **25**(21): 5217-24.
- Jarrard, L. E. (1993). "On the role of the hippocampus in learning and memory in the rat." *Behav Neural Biol* **60**(1): 9-26.
- Jarrett, J. T., E. P. Berger and P. T. Lansbury, Jr. (1993). "The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease." *Biochemistry* **32**(18): 4693-7.
- Jenkins, B. G., P. Klivenyi, E. Kustermann, et al. (2000). "Nonlinear decrease over time in N-acetyl aspartate levels in the absence of neuronal loss and increases in glutamine and glucose in transgenic Huntington's disease mice." *J Neurochem* **74**(5): 2108-19.
- Jimenez-Jimenez, F. J., J. A. Molina, F. de Bustos, et al. (1999). "Serum levels of beta-carotene, alpha-carotene and vitamin A in patients with Alzheimer's disease." *Eur J Neurol* **6**(4): 495-7.
- Jimenez-Lara, A. M., N. Clarke, L. Altucci, et al. (2004). "Retinoic-acid-induced apoptosis in leukemia cells." *Trends Mol Med* **10**(10): 508-15.
- Jin, K., A. L. Peel, X. O. Mao, et al. (2004). "Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(1): 343-7.
- JL, V. (1999). *Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals*. Oxford, Terrestrial Vertebrates.
- Jodar, L. and H. Kaneto (1995). "Synaptic plasticity: stairway to memory." *Jpn J Pharmacol* **68**(4): 359-87.
- Johnson, E. J., S. D. Krasinski and R. M. Russell (1992). "Sex differences in postabsorptive plasma vitamin A transport." *Am J Clin Nutr* **56**(5): 911-6.



Johnson, S. A., T. McNeill, B. Cordell, et al. (1990). "Relation of neuronal APP-751/APP-695 mRNA ratio and neuritic plaque density in Alzheimer's disease." Science **248**(4957): 854-7.

<b>K</b>
----------

- Kalmijn, S., K. M. Mehta, H. A. Pols, et al. (2000). "Subclinical hyperthyroidism and the risk of dementia. The Rotterdam study." Clin Endocrinol (Oxf) **53**(6): 733-7.
- Kalra, S., N. R. Cashman, A. Genge, et al. (1998). "Recovery of N-acetylaspartate in corticomotor neurons of patients with ALS after riluzole therapy." Neuroreport **9**(8): 1757-61.
- Kamal, A., G. B. Stokin, Z. Yang, et al. (2000). "Axonal transport of amyloid precursor protein is mediated by direct binding to the kinesin light chain subunit of kinesin-I." Neuron **28**(2): 449-59.
- Kampmann, E., S. Johann, S. van Neerven, et al. (2008). "Anti-inflammatory effect of retinoic acid on prostaglandin synthesis in cultured cortical astrocytes." J Neurochem **106**(1): 320-32.
- Kane, M. A., N. Chen, S. Sparks, et al. (2005). "Quantification of endogenous retinoic acid in limited biological samples by LC/MS/MS." Biochem J **388**(Pt 1): 363-9.
- Kantarci, K., D. S. Knopman, D. W. Dickson, et al. (2008). "Alzheimer disease: postmortem neuropathologic correlates of antemortem 1H MR spectroscopy metabolite measurements." Radiology **248**(1): 210-20.
- Kantarci, K., R. C. Petersen, S. A. Przybelski, et al. (2008). "Hippocampal volumes, proton magnetic resonance spectroscopy metabolites, and cerebrovascular disease in mild cognitive impairment subtypes." Arch Neurol **65**(12): 1621-8.
- Kaplan, M. S. and D. H. Bell (1983). "Neuronal proliferation in the 9-month-old rodent-radioautographic study of granule cells in the hippocampus." Exp Brain Res **52**(1): 1-5.
- Kato, S., H. Mano, T. Kumazawa, et al. (1992). "Effect of retinoid status on alpha, beta and gamma retinoic acid receptor mRNA levels in various rat tissues." Biochem J **286** (Pt 3): 755-60.
- Katzenellenbogen, J. A., B. W. O'Malley and B. S. Katzenellenbogen (1996). "Tripartite steroid hormone receptor pharmacology: interaction with multiple effector sites as a basis for the cell- and promoter-specific action of these hormones." Mol Endocrinol **10**(2): 119-31.
- Katzman, R. (1986). "Alzheimer's disease." N Engl J Med **314**(15): 964-73.
- Kawa, J. M., R. Przybylski and C. G. Taylor (2003). "Urinary chiro-inositol and myo-inositol excretion is elevated in the diabetic db/db mouse and streptozotocin diabetic rat." Exp Biol Med (Maywood) **228**(8): 907-14.
- Kawabata, S., G. A. Higgins and J. W. Gordon (1991). "Amyloid plaques, neurofibrillary tangles and neuronal loss in brains of transgenic mice overexpressing a C-terminal fragment of human amyloid precursor protein." Nature **354**(6353): 476-8.
- Kawaguchi, R., J. Yu, J. Honda, et al. (2007). "A membrane receptor for retinol binding protein mediates cellular uptake of vitamin A." Science **315**(5813): 820-5.
- Kawas, C. H. (2003). "Clinical practice. Early Alzheimer's disease." N Engl J Med **349**(11): 1056-63.
- Kheirvari, S., K. Uezu, T. Sakai, et al. (2006). "Increased nerve growth factor by zinc supplementation with concurrent vitamin A deficiency does not improve memory performance in mice." J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo) **52**(6): 421-7.

- Kidd, M. (1963). "Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease." Nature **197**: 192-3.
- Kim, Y. W., R. P. Sharma and J. K. Li (1994). "Characterization of heterologously expressed recombinant retinoic acid receptors with natural or synthetic retinoids." J Biochem Toxicol **9**(5): 225-34.
- Kitabatake, Y., K. A. Sailor, G. L. Ming, et al. (2007). "Adult neurogenesis and hippocampal memory function: new cells, more plasticity, new memories?" Neurosurg Clin N Am **18**(1): 105-13, x.
- Kivipelto, M., E. L. Helkala, M. P. Laakso, et al. (2001). "Midlife vascular risk factors and Alzheimer's disease in later life: longitudinal, population based study." Bmj **322**(7300): 1447-51.
- Klein, E. S., J. W. Wang, B. Khalifa, et al. (2000). "Recruitment of nuclear receptor corepressor and coactivator to the retinoic acid receptor by retinoid ligands. Influence of DNA-heterodimer interactions." J Biol Chem **275**(25): 19401-8.
- Klein, R. L., A. C. Hirko, C. A. Meyers, et al. (2000). "NGF gene transfer to intrinsic basal forebrain neurons increases cholinergic cell size and protects from age-related, spatial memory deficits in middle-aged rats." Brain Res **875**(1-2): 144-51.
- Klyubin, I., D. M. Walsh, C. A. Lemere, et al. (2005). "Amyloid beta protein immunotherapy neutralizes A $\beta$  oligomers that disrupt synaptic plasticity in vivo." Nat Med **11**(5): 556-61.
- Knopman, D., L. L. Boland, T. Mosley, et al. (2001). "Cardiovascular risk factors and cognitive decline in middle-aged adults." Neurology **56**(1): 42-8.
- Kobayashi, M., K. Kurihara and I. Matsuoka (1994). "Retinoic acid induces BDNF responsiveness of sympathetic neurons by alteration of Trk neurotrophin receptor expression." FEBS Lett **356**(1): 60-5.
- Koide, A., S. Abbatiello, L. Rothgery, et al. (2002). "Probing protein conformational changes in living cells by using designer binding proteins: application to the estrogen receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(3): 1253-8.
- Koike, H., S. Tomioka, H. Sorimachi, et al. (1999). "Membrane-anchored metalloprotease MDC9 has an alpha-secretase activity responsible for processing the amyloid precursor protein." Biochem J **343 Pt 2**: 371-5.
- Kojro, E. and F. Fahrenholz (2005). "The non-amyloidogenic pathway: structure and function of alpha-secretases." Subcell Biochem **38**: 105-27.
- König, G., C. L. Masters and K. Beyreuther (1990). "Retinoic acid induced differentiated neuroblastoma cells show increased expression of the beta A4 amyloid gene of Alzheimer's disease and an altered splicing pattern." FEBS Lett **269**(2): 305-10.
- König, G., M. Salbaum, O. Wiestler, et al. (1991). "Alternative splicing of the [beta]A4 amyloid gene of Alzheimer's disease in cortex of control and Alzheimer's disease patients." Molecular Brain Research **9**(3): 259.
- Koob, G. F. (2003). "Alcoholism: allostasis and beyond." Alcohol Clin Exp Res **27**(2): 232-43.
- Koob, G. F. and M. Le Moal (2001). "Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis." Neuropsychopharmacology **24**(2): 97-129.
- Kosik, K. S., C. L. Joachim and D. J. Selkoe (1986). "Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(11): 4044-8.
- Krezel, W., P. Kastner and P. Chambon (1999). "Differential expression of retinoid receptors in the adult mouse central nervous system." Neuroscience **89**(4): 1291-300.
- Kronenberg, G., A. Bick-Sander, E. Bunk, et al. (2006). "Physical exercise prevents age-related decline in precursor cell activity in the mouse dentate gyrus." Neurobiol Aging **27**(10): 1505-13.

- Kronenberg, G., K. Reuter, B. Steiner, et al. (2003). "Subpopulations of proliferating cells of the adult hippocampus respond differently to physiologic neurogenic stimuli." J Comp Neurol **467**(4): 455-63.
- Kukull, W. A. and J. D. Bowen (2002). "Dementia epidemiology." Med Clin North Am **86**(3): 573-90.
- Kumar-Singh, S., J. Theuns, B. Van Broeck, et al. (2006). "Mean age-of-onset of familial alzheimer disease caused by presenilin mutations correlates with both increased Abeta42 and decreased Abeta40." Hum Mutat **27**(7): 686-95.
- Kumar, A. and T. C. Foster (2005). "Intracellular calcium stores contribute to increased susceptibility to LTD induction during aging." Brain Res **1031**(1): 125-8.
- Kumar, V. B., M. Franko, W. A. Banks, et al. (2009). "Increase in presenilin 1 (PS1) levels in senescence-accelerated mice (SAMP8) may indirectly impair memory by affecting amyloid precursor protein (APP) processing." J Exp Biol **212**(Pt 4): 494-8.
- Kurlandsky, S. B., M. V. Gamble, R. Ramakrishnan, et al. (1995). "Plasma delivery of retinoic acid to tissues in the rat." J Biol Chem **270**(30): 17850-7.

<b>L</b>
----------

- Lammich, S., E. Kojro, R. Postina, et al. (1999). "Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(7): 3922-7.
- Landfield, P. W. (1988). "Commentary on biomarkers of aging in the nervous system." Exp Gerontol **23**(4-5): 413-6.
- Landfield, P. W. (1988). "Hippocampal neurobiological mechanisms of age-related memory dysfunction." Neurobiol Aging **9**(5-6): 571-9.
- Lane, M. A. and S. J. Bailey (2005). "Role of retinoid signalling in the adult brain." Prog Neurobiol **75**(4): 275-93.
- Lanz, T. A., D. B. Carter and K. M. Merchant (2003). "Dendritic spine loss in the hippocampus of young PDAPP and Tg2576 mice and its prevention by the ApoE2 genotype." Neurobiol Dis **13**(3): 246-53.
- Larrieu, S., L. Letenneur, J. M. Orgogozo, et al. (2002). "Incidence and outcome of mild cognitive impairment in a population-based prospective cohort." Neurology **59**(10): 1594-9.
- Larsson, E., R. J. Mandel, R. L. Klein, et al. (2002). "Suppression of insult-induced neurogenesis in adult rat brain by brain-derived neurotrophic factor." Exp Neurol **177**(1): 1-8.
- Latasa, M. J., B. Belandia and A. Pascual (1998). "Thyroid hormones regulate beta-amyloid gene splicing and protein secretion in neuroblastoma cells." Endocrinology **139**(6): 2692-8.
- Laudon, H., B. Winblad and J. Naslund (2007). "The Alzheimer's disease-associated gamma-secretase complex: functional domains in the presenilin 1 protein." Physiol Behav **92**(1-2): 115-20.
- Launer, L. J., L. R. White, H. Petrovitch, et al. (2001). "Cholesterol and neuropathologic markers of AD: a population-based autopsy study." Neurology **57**(8): 1447-52.
- Lazar, M. A. (2003). "Nuclear receptor corepressors." Nucl Recept Signal **1**: e001.
- Le Doze, F., D. Debruyne, F. Albessard, et al. (2000). "Pharmacokinetics of all-trans retinoic acid, 13-cis retinoic acid, and fenretinide in plasma and brain of Rat." Drug Metab Dispos **28**(2): 205-8.

- Leal, M. C., V. B. Dorfman, A. F. Gamba, et al. (2006). "Plaque-associated overexpression of insulin-degrading enzyme in the cerebral cortex of aged transgenic tg2576 mice with Alzheimer pathology." *J Neuropathol Exp Neurol* **65**(10): 976-87.
- Lebel, J. M., S. L'Herault, J. H. Dussault, et al. (1993). "Thyroid hormone up-regulates thyroid hormone receptor beta gene expression in rat cerebral hemisphere astrocyte cultures." *Glia* **9**(2): 105-12.
- Leclercq, M. and M. Bourgeay-Causse (1981). "Une méthode simple, fiable rapide: dosage simultané du rétinol et du tocophérol sérique par chromatographie liquide haute performance (A simple, reliable fast method: simultaneous proportioning of retinol and serum tocopherol by high performance liquid chromatography)." *Revue Institut Pasteur Lyon* **14**: 475-496.
- Leclere, J., J. Orgiazzi, B. Rousset, et al. (1992). "La thyroïde."
- Lee, G., R. Thangavel, V. M. Sharma, et al. (2004). "Phosphorylation of tau by fyn: implications for Alzheimer's disease." *J Neurosci* **24**(9): 2304-12.
- Lee, J., W. Duan and M. P. Mattson (2002). "Evidence that brain-derived neurotrophic factor is required for basal neurogenesis and mediates, in part, the enhancement of neurogenesis by dietary restriction in the hippocampus of adult mice." *J Neurochem* **82**(6): 1367-75.
- Lee, M. L., F. C. Kuo, G. A. Whitmore, et al. (2000). "Importance of replication in microarray gene expression studies: statistical methods and evidence from repetitive cDNA hybridizations." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(18): 9834-9.
- Lefebvre, P., P. J. Martin, S. Flajollet, et al. (2005). "Transcriptional activities of retinoic acid receptors." *Vitam Horm* **70**: 199-264.
- Leloup, C., C. Magnan, A. Benani, et al. (2006). "Mitochondrial reactive oxygen species are required for hypothalamic glucose sensing." *Diabetes* **55**(7): 2084-90.
- Leroy, P., A. Krust, A. Zelent, et al. (1991). "Multiple isoforms of the mouse retinoic acid receptor alpha are generated by alternative splicing and differential induction by retinoic acid." *Embo J* **10**(1): 59-69.
- Letenneur, L., V. Gilleron, D. Commenges, et al. (1999). "Are sex and educational level independent predictors of dementia and Alzheimer's disease? Incidence data from the PAQUID project." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **66**(2): 177-83.
- Letenneur, L., S. Larrieu and P. Barberger-Gateau (2004). "Alcohol and tobacco consumption as risk factors of dementia: a review of epidemiological studies." *Biomed Pharmacother* **58**(2): 95-9.
- Levin, A. A., L. J. Sturzenbecker, S. Kazmer, et al. (1992). "9-cis retinoic acid stereoisomer binds and activates the nuclear receptor RXR alpha." *Nature* **355**(6358): 359-61.
- Lewin, G. R. and Y. A. Barde (1996). "Physiology of the neurotrophins." *Annu Rev Neurosci* **19**: 289-317.
- Li, R., K. Lindholm, L. B. Yang, et al. (2004). "Amyloid beta peptide load is correlated with increased beta-secretase activity in sporadic Alzheimer's disease patients." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(10): 3632-7.
- Li, Y., W. Zhou, Y. Tong, et al. (2006). "Control of APP processing and Abeta generation level by BACE1 enzymatic activity and transcription." *Faseb J* **20**(2): 285-92.
- Li, Y. M., M. T. Lai, M. Xu, et al. (2000). "Presenilin 1 is linked with gamma-secretase activity in the detergent solubilized state." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(11): 6138-43.
- Li, Y. M., M. Xu, M. T. Lai, et al. (2000). "Photoactivated gamma-secretase inhibitors directed to the active site covalently label presenilin 1." *Nature* **405**(6787): 689-94.
- Liang, X., N. Schnetz-Boutaud, S. J. Kenealy, et al. (2006). "Covariate analysis of late-onset Alzheimer disease refines the chromosome 12 locus." *Mol Psychiatry* **11**(3): 280-5.
- Liang, Y., S. Lin, T. P. Beyer, et al. (2004). "A liver X receptor and retinoid X receptor heterodimer mediates apolipoprotein E expression, secretion and cholesterol homeostasis in astrocytes." *J Neurochem* **88**(3): 623-34.

- Lichtenwalner, R. J., M. E. Forbes, S. A. Bennett, et al. (2001). "Intracerebroventricular infusion of insulin-like growth factor-I ameliorates the age-related decline in hippocampal neurogenesis." *Neuroscience* **107**(4): 603-13.
- Lin, P. I., E. R. Martin, C. A. Browning-Large, et al. (2006). "Parsing the genetic heterogeneity of chromosome 12q susceptibility genes for Alzheimer disease by family-based association analysis." *Neurogenetics* **7**(3): 157-65.
- Lindeboom, R., B. Schmand, R. Holman, et al. (2004). "Improved brief assessment of cognition in aging and dementia." *Neurology* **63**(3): 543-6.
- Lindner, M. D., S. I. Dworetzky, C. Sampson, et al. (1994). "Relationship of APP mRNA transcripts and levels of NGF and low-affinity NGF receptors to behavioral measures of age-related cognitive dysfunction." *J Neurosci* **14**(4): 2282-9.
- Lindvall, O. and Z. Kokaia (2005). "Stem cell therapy for human brain disorders." *Kidney Int* **68**(5): 1937-9.
- Lindvall, O. and Z. Kokaia (2006). "Stem cells for the treatment of neurological disorders." *Nature* **441**(7097): 1094-6.
- Liu, H., H. Wang, S. Shenvi, et al. (2004). "Glutathione metabolism during aging and in Alzheimer disease." *Ann N Y Acad Sci* **1019**: 346-9.
- Liu, S., J. Wang, D. Zhu, et al. (2003). "Generation of functional inhibitory neurons in the adult rat hippocampus." *J Neurosci* **23**(3): 732-6.
- Lopez-Boado, Y. S., M. Klaus, M. I. Dawson, et al. (1996). "Retinoic acid-induced expression of apolipoprotein D and concomitant growth arrest in human breast cancer cells are mediated through a retinoic acid receptor RARalpha-dependent signaling pathway." *J Biol Chem* **271**(50): 32105-11.
- Lowndes, G. and G. Savage (2007). "Early detection of memory impairment in Alzheimer's disease: a neurocognitive perspective on assessment." *Neuropsychol Rev* **17**(3): 193-202.
- Luchsinger, J. A. and R. Mayeux (2004). "Dietary factors and Alzheimer's disease." *Lancet Neurol* **3**(10): 579-87.
- Luchsinger, J. A., M. X. Tang, M. Siddiqui, et al. (2004). "Alcohol intake and risk of dementia." *J Am Geriatr Soc* **52**(4): 540-6.
- Luna-Medina, R., M. Cortes-Canteli, M. Alonso, et al. (2005). "Regulation of inflammatory response in neural cells in vitro by thiadiazolidinones derivatives through peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation." *J Biol Chem* **280**(22): 21453-62.
- Luo, T., E. Wagner, J. E. Crandall, et al. (2004). "A retinoic-acid critical period in the early postnatal mouse brain." *Biol Psychiatry* **56**(12): 971-80.

<b>M</b>
----------

- Ma, D. K., G. L. Ming and H. Song (2005). "Glial influences on neural stem cell development: cellular niches for adult neurogenesis." *Curr Opin Neurobiol* **15**(5): 514-20.
- Ma, W., D. Maric, B. S. Li, et al. (2000). "Acetylcholine stimulates cortical precursor cell proliferation in vitro via muscarinic receptor activation and MAP kinase phosphorylation." *Eur J Neurosci* **12**(4): 1227-40.
- Maden, M. (2001). "Role and distribution of retinoic acid during CNS development." *Int Rev Cytol* **209**: 1-77.
- Maden, M. (2002). "Retinoid signalling in the development of the central nervous system." *Nat Rev Neurosci* **3**(11): 843-53.
- Maden, M. (2006). "Retinoids and spinal cord development." *J Neurobiol* **66**(7): 726-38.

- Maden, M. (2007). "Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous system." *Nat Rev Neurosci* **8**(10): 755-65.
- Maden, M., E. Gale and M. Zile (1998). "The role of vitamin A in the development of the central nervous system." *J Nutr* **128**(2 Suppl): 471S-475S.
- Maden, M. and M. Hind (2003). "Retinoic acid, a regeneration-inducing molecule." *Dev Dyn* **226**(2): 237-44.
- Madsen, T. M., P. E. Kristjansen, T. G. Bolwig, et al. (2003). "Arrested neuronal proliferation and impaired hippocampal function following fractionated brain irradiation in the adult rat." *Neuroscience* **119**(3): 635-42.
- Maggio, N., S. Sellitti, C. P. Capano, et al. (2001). "Tissue-transglutaminase in rat and human brain: light and electron immunocytochemical analysis and in situ hybridization study." *Brain Res Bull* **56**(3-4): 173-82.
- Mailliot, C., T. Bussiere, M. Hamdane, et al. (2000). "Pathological tau phenotypes. The weight of mutations, polymorphisms, and differential neuronal vulnerabilities." *Ann N Y Acad Sci* **920**: 107-14.
- Mailliot, C., V. Podevin-Dimster, R. E. Rosenthal, et al. (2000). "Rapid tau protein dephosphorylation and differential rephosphorylation during cardiac arrest-induced cerebral ischemia and reperfusion." *J Cereb Blood Flow Metab* **20**(3): 543-9.
- Malenka, R. C. (1994). "Synaptic plasticity in the hippocampus: LTP and LTD." *Cell* **78**(4): 535-8.
- Malik, M. A., J. K. Blusztajn and C. E. Greenwood (2000). "Nutrients as trophic factors in neurons and the central nervous system: role of retinoic acid." *J Nutr Biochem* **11**(1): 2-13.
- Malik, M. A., C. E. Greenwood, J. K. Blusztajn, et al. (2000). "Cholinergic differentiation triggered by blocking cell proliferation and treatment with all-trans-retinoic acid." *Brain Res* **874**(2): 178-85.
- Mangelsdorf, D. J. (1994). "Vitamin A receptors." *Nutr Rev* **52**(2 Pt 2): S32-44.
- Mangelsdorf, D. J. and R. M. Evans (1995). "The RXR heterodimers and orphan receptors." *Cell* **83**(6): 841-50.
- Mangelsdorf, D. J., S. A. Kliewer, A. Kakizuka, et al. (1993). "Retinoid receptors." *Recent Prog Horm Res* **48**: 99-121.
- Mangelsdorf, D. J., E. S. Ong, J. A. Dyck, et al. (1990). "Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway." *Nature* **345**(6272): 224-9.
- Mangelsdorf, D. J., C. Thummel, M. Beato, et al. (1995). "The nuclear receptor superfamily: the second decade." *Cell* **83**(6): 835-9.
- Mani, S., Y. Shen, J. Schaefer, et al. (2001). "Failure to express GAP-43 during neurogenesis affects cell cycle regulation and differentiation of neural precursors and stimulates apoptosis of neurons." *Mol Cell Neurosci* **17**(1): 54-66.
- Mann, K. M., F. E. Thorngate, Y. Katoh-Fukui, et al. (2004). "Independent effects of APOE on cholesterol metabolism and brain A $\beta$  levels in an Alzheimer disease mouse model." *Hum Mol Genet* **13**(17): 1959-68.
- Mao, C. T., T. Y. Li, Y. X. Liu, et al. (2005). "[Effects of marginal vitamin A deficiency and intervention on learning and memory in young rats]." *Zhonghua Er Ke Za Zhi* **43**(7): 526-30.
- Marcinkiewicz, M. and N. G. Seidah (2000). "Coordinated expression of beta-amyloid precursor protein and the putative beta-secretase BACE and alpha-secretase ADAM10 in mouse and human brain." *J Neurochem* **75**(5): 2133-43.
- Maret, S., P. Franken, Y. Dauvilliers, et al. (2005). "Retinoic acid signaling affects cortical synchrony during sleep." *Science* **310**(5745): 111-3.
- Marighetto, A., N. Etchamendy, K. Touzani, et al. (1999). "Knowing which and knowing what: a potential mouse model for age-related human declarative memory decline." *Eur J Neurosci* **11**(9): 3312-22.

- Marill, J., N. Idres, C. C. Capron, et al. (2003). "Retinoic acid metabolism and mechanism of action: a review." *Curr Drug Metab* **4**(1): 1-10.
- Martin, H., M. P. Lambert, K. Barber, et al. (1995). "Alzheimer's-associated phospho-tau epitope in human neuroblastoma cell cultures: up-regulation by fibronectin and laminin." *Neuroscience* **66**(4): 769-79.
- Martinez, S. E., J. Vaglenova, J. Sabria, et al. (2001). "Distribution of alcohol dehydrogenase mRNA in the rat central nervous system. Consequences for brain ethanol and retinoid metabolism." *Eur J Biochem* **268**(19): 5045-56.
- Mason, G. A., C. H. Walker and A. J. Prange, Jr. (1993). "L-triiodothyronine: is this peripheral hormone a central neurotransmitter?" *Neuropsychopharmacology* **8**(3): 253-8.
- Masters, C. L. and K. Beyreuther (1987). "Neuronal origin of cerebral amyloidogenic proteins: their role in Alzheimer's disease and unconventional virus diseases of the nervous system." *Ciba Found Symp* **126**: 49-64.
- Masters, C. L., G. Simms, N. A. Weinman, et al. (1985). "Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome." *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**(12): 4245-9.
- Maurer, K., S. Volk and H. Gerbaldo (1997). "Auguste D and Alzheimer's disease." *Lancet* **349**(9064): 1546-9.
- McCaffery, P. and U. C. Drager (1994). "High levels of a retinoic acid-generating dehydrogenase in the meso-telencephalic dopamine system." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(16): 7772-6.
- McCaffery, P. and U. C. Drager (1994). "Hot spots of retinoic acid synthesis in the developing spinal cord." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(15): 7194-7.
- McCaffery, P. and U. C. Drager (1995). "Retinoic acid synthesizing enzymes in the embryonic and adult vertebrate." *Adv Exp Med Biol* **372**: 173-83.
- McCaffery, P. and U. C. Drager (2000). "Regulation of retinoic acid signaling in the embryonic nervous system: a master differentiation factor." *Cytokine Growth Factor Rev* **11**(3): 233-49.
- McCaffery, P., M. O. Lee, M. A. Wagner, et al. (1992). "Asymmetrical retinoic acid synthesis in the dorsoventral axis of the retina." *Development* **115**(2): 371-82.
- McCaffery, P., J. Zhang and J. E. Crandall (2006). "Retinoic acid signaling and function in the adult hippocampus." *J Neurobiol* **66**(7): 780-91.
- McCaffery, P. J., J. Adams, M. Maden, et al. (2003). "Too much of a good thing: retinoic acid as an endogenous regulator of neural differentiation and exogenous teratogen." *Eur J Neurosci* **18**(3): 457-72.
- McDonald, H. Y. and J. M. Wojtowicz (2005). "Dynamics of neurogenesis in the dentate gyrus of adult rats." *Neurosci Lett* **385**(1): 70-5.
- McEwan, I. J. (2009). "Nuclear receptors: one big family." *Methods Mol Biol* **505**: 3-18.
- McKay, R. (1997). "Stem cells in the central nervous system." *Science* **276**(5309): 66-71.
- McLaren, D. S., Z. Mawlayi and A. Downing (1979). "Distribution of vitamin A in human liver." *Proc Nutr Soc* **38**(2): 49A.
- Meda, L., P. Baron and G. Scarlato (2001). "Glial activation in Alzheimer's disease: the role of Aβeta and its associated proteins." *Neurobiol Aging* **22**(6): 885-93.
- Melino, G., M. Draoui, S. Bernardini, et al. (1996). "Regulation by retinoic acid of insulin-degrading enzyme and of a related endoprotease in human neuroblastoma cell lines." *Cell Growth Differ* **7**(6): 787-96.
- Mendes-de-Aguiar, C. B., R. Alchini, H. Decker, et al. (2008). "Thyroid hormone increases astrocytic glutamate uptake and protects astrocytes and neurons against glutamate toxicity." *J Neurosci Res* **86**(14): 3117-25.
- Merrill, D. A., R. Karim, M. Darraq, et al. (2003). "Hippocampal cell genesis does not correlate with spatial learning ability in aged rats." *J Comp Neurol* **459**(2): 201-7.

- Mesaros-Kanjiski, E., I. Kontosic, Z. Kusic, et al. (1999). "Endemic goitre and plasmatic levels of vitamins A and E in the school-children on the island of Krk, Croatia." Coll Antropol **23**(2): 729-36.
- Metsis, M. (2001). "Genes for neurotrophic factors and their receptors: structure and regulation." Cell Mol Life Sci **58**(8): 1014-20.
- Meunier, M., Bachevalier, J., & Mishkin, M. (1994). "L'anatomie de la mémoire." La Recherche **25**: 760-766.
- Mey, J. and P. McCaffery (2004). "Retinoic acid signaling in the nervous system of adult vertebrates." Neuroscientist **10**(5): 409-21.
- Micheau, J., G. Riedel, E. L. Roloff, et al. (2004). "Reversible hippocampal inactivation partially dissociates how and where to search in the water maze." Behav Neurosci **118**(5): 1022-32.
- Mickes, L., J. T. Wixted, C. Fennema-Notestine, et al. (2007). "Progressive impairment on neuropsychological tasks in a longitudinal study of preclinical Alzheimer's disease." Neuropsychology **21**(6): 696-705.
- Miller, B. C., E. A. Eckman, K. Sambamurti, et al. (2003). "Amyloid-beta peptide levels in brain are inversely correlated with insulin activity levels in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(10): 6221-6.
- Miller, K. J., T. D. Parsons, P. C. Whybrow, et al. (2006). "Memory improvement with treatment of hypothyroidism." Int J Neurosci **116**(8): 895-906.
- Miller, M. W. and R. S. Nowakowski (1988). "Use of bromodeoxyuridine-immunohistochemistry to examine the proliferation, migration and time of origin of cells in the central nervous system." Brain Res **457**(1): 44-52.
- Miners, J. S., S. Baig, J. Palmer, et al. (2008). "Abeta-degrading enzymes in Alzheimer's disease." Brain Pathol **18**(2): 240-52.
- Ming, G. L. and H. Song (2005). "Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system." Annu Rev Neurosci **28**: 223-50.
- Mingaud, F., C. Le Moine, N. Etchamendy, et al. (2007). "The hippocampus plays a critical role at encoding discontinuous events for subsequent declarative memory expression in mice." Hippocampus **17**(4): 264-70.
- Mingaud, F., C. Mormede, N. Etchamendy, et al. (2008). "Retinoid hyposignaling contributes to aging-related decline in hippocampal function in short-term/working memory organization and long-term declarative memory encoding in mice." J Neurosci **28**(1): 279-91.
- Mingaud, F., C. Mormede, N. Etchamendy, et al. (2007). "All life vitamin A supplementation in mice protects against aging-related hypoexpression of hippocampal retinoid signaling and working memory decline." En soumission.
- Mino, M., H. Tamai, T. Tanabe, et al. (1993). "Nutritional status of antioxidant vitamins (A, E, and beta-carotene) in elderly Japanese." J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo) **39 Suppl**: S67-74.
- Mishizen-Eberz, A. J., R. A. Rissman, T. L. Carter, et al. (2004). "Biochemical and molecular studies of NMDA receptor subunits NR1/2A/2B in hippocampal subregions throughout progression of Alzheimer's disease pathology." Neurobiol Dis **15**(1): 80-92.
- Misner, D. L., S. Jacobs, Y. Shimizu, et al. (2001). "Vitamin A deprivation results in reversible loss of hippocampal long-term synaptic plasticity." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(20): 11714-9.
- Mitsuhashi, T., G. Tennyson and V. Nikodem (1988). "Nucleotide sequence of novel cDNAs generated by alternative splicing of a rat thyroid hormone receptor gene transcript." Nucleic Acids Res **16**(12): 5697.



- Miyakawa, T., E. Yared, J. H. Pak, et al. (2001). "Neurogranin null mutant mice display performance deficits on spatial learning tasks with anxiety related components." *Hippocampus* **11**(6): 763-75.
- Mobarhan, S., H. K. Seitz, R. M. Russell, et al. (1991). "Age-related effects of chronic ethanol intake on vitamin A status in Fisher 344 rats." *J Nutr* **121**(4): 510-7.
- Mobarhan, S. and L. S. Trumbore (1991). "Nutritional problems of the elderly." *Clin Geriatr Med* **7**(2): 191-214.
- Moffat, S. D., A. B. Zonderman and S. M. Resnick (2001). "Age differences in spatial memory in a virtual environment navigation task." *Neurobiol Aging* **22**(5): 787-96.
- Moffett, J. R., B. Ross, P. Arun, et al. (2007). "N-Acetylaspartate in the CNS: from neurodiagnostics to neurobiology." *Prog Neurobiol* **81**(2): 89-131.
- Mohapel, P., G. Leanza, M. Kokaia, et al. (2005). "Forebrain acetylcholine regulates adult hippocampal neurogenesis and learning." *Neurobiol Aging* **26**(6): 939-46.
- Mohapel, P., K. Mundt-Petersen, P. Brundin, et al. (2006). "Working memory training decreases hippocampal neurogenesis." *Neuroscience* **142**(3): 609-13.
- Moir, R. D., C. S. Atwood, D. M. Romano, et al. (1999). "Differential effects of apolipoprotein E isoforms on metal-induced aggregation of A beta using physiological concentrations." *Biochemistry* **38**(14): 4595-603.
- Monaco, H. L. (2000). "The transthyretin-retinol-binding protein complex." *Biochim Biophys Acta* **1482**(1-2): 65-72.
- Mons, N., V. Enderlin, R. Jaffard, et al. (2001). "Selective age-related changes in the PKC-sensitive, calmodulin-binding protein, neurogranin, in the mouse brain." *J Neurochem* **79**(4): 859-67.
- Mooradian, A. D. (1993). "Mechanisms of age-related endocrine alterations. Part I." *Drugs Aging* **3**(1): 81-97.
- Mooradian, A. D. and P. J. Scarpace (1993). "3,5,3'-L-triiodothyronine regulation of beta-adrenergic receptor density and adenylyl cyclase activity in synaptosomal membranes of aged rats." *Neurosci Lett* **161**(1): 101-4.
- Moore, G. J. and M. P. Galloway (2002). "Magnetic resonance spectroscopy: neurochemistry and treatment effects in affective disorders." *Psychopharmacol Bull* **36**(2): 5-23.
- Moreira, P. I., S. L. Siedlak, G. Aliev, et al. (2005). "Oxidative stress mechanisms and potential therapeutics in Alzheimer disease." *J Neural Transm* **112**(7): 921-32.
- Moreno-Flores, M. T., M. Medina and F. Wandosell (1999). "Expression of presenilin 1 in nervous system during rat development." *J Comp Neurol* **410**(4): 556-70.
- Moreno, S., S. Farioli-Vecchioli and M. P. Ceru (2004). "Immunolocalization of peroxisome proliferator-activated receptors and retinoid X receptors in the adult rat CNS." *Neuroscience* **123**(1): 131-45.
- Morris, M. C., D. A. Evans, J. L. Bienias, et al. (2002). "Dietary intake of antioxidant nutrients and the risk of incident Alzheimer disease in a biracial community study." *Jama* **287**(24): 3230-7.
- Morris, M. S. (2002). "Folate, homocysteine, and neurological function." *Nutr Clin Care* **5**(3): 124-32.
- Morris, P. and G. H. Anderson (1986). "The effects of early dietary experience on subsequent protein selection in the rat." *Physiol Behav* **36**(2): 271-6.
- Morris, R. G. (2006). "Elements of a neurobiological theory of hippocampal function: the role of synaptic plasticity, synaptic tagging and schemas." *Eur J Neurosci* **23**(11): 2829-46.
- Morte, B., J. Manzano, T. Scanlan, et al. (2002). "Deletion of the thyroid hormone receptor alpha 1 prevents the structural alterations of the cerebellum induced by hypothyroidism." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(6): 3985-9.
- Moser, E., M. B. Moser and P. Andersen (1993). "Spatial learning impairment parallels the magnitude of dorsal hippocampal lesions, but is hardly present following ventral lesions." *J Neurosci* **13**(9): 3916-25.

- Moser, E. I., K. A. Krobot, M. B. Moser, et al. (1998). "Impaired spatial learning after saturation of long-term potentiation." Science **281**(5385): 2038-42.
- Muffat, J., D. W. Walker and S. Benzer (2008). "Human ApoD, an apolipoprotein up-regulated in neurodegenerative diseases, extends lifespan and increases stress resistance in *Drosophila*." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(19): 7088-93.
- Mufson, E. J., J. M. Conner and J. H. Kordower (1995). "Nerve growth factor in Alzheimer's disease: defective retrograde transport to nucleus basalis." Neuroreport **6**(7): 1063-6.
- Mufson, E. J., J. S. Kroin, T. J. Sendera, et al. (1999). "Distribution and retrograde transport of trophic factors in the central nervous system: functional implications for the treatment of neurodegenerative diseases." Prog Neurobiol **57**(4): 451-84.
- Mullan, M., F. Crawford, K. Axelman, et al. (1992). "A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid." Nat Genet **1**(5): 345-7.
- Murrell, J., M. Farlow, B. Ghetti, et al. (1991). "A mutation in the amyloid precursor protein associated with hereditary Alzheimer's disease." Science **254**(5028): 97-9.

<b>N</b>
----------

- Nagy, L., M. Saydak, N. Shipley, et al. (1996). "Identification and characterization of a versatile retinoid response element (retinoic acid receptor response element-retinoid X receptor response element) in the mouse tissue transglutaminase gene promoter." J Biol Chem **271**(8): 4355-65.
- Nakamura, S., N. Murayama, T. Noshita, et al. (2001). "Progressive brain dysfunction following intracerebroventricular infusion of beta(1-42)-amyloid peptide." Brain Res **912**(2): 128-36.
- Napoli, J. L. (1996). "Retinoic acid biosynthesis and metabolism." Faseb J **10**(9): 993-1001.
- Napoli, J. L. (1999). "Interactions of retinoid binding proteins and enzymes in retinoid metabolism." Biochim Biophys Acta **1440**(2-3): 139-62.
- Napoli, J. L. (1999). "Retinoic acid: its biosynthesis and metabolism." Prog Nucleic Acid Res Mol Biol **63**: 139-88.
- Napoli, J. L., K. C. Posch and R. D. Burns (1992). "Microsomal retinal synthesis: retinol vs. holo-CRBP as substrate and evaluation of NADP, NAD and NADPH as cofactors." Biochim Biophys Acta **1120**(2): 183-6.
- Nayak, N., E. H. Harrison and M. M. Hussain (2001). "Retinyl ester secretion by intestinal cells: a specific and regulated process dependent on assembly and secretion of chylomicrons." J Lipid Res **42**(2): 272-80.
- Nedergaard, M., B. Ransom and S. A. Goldman (2003). "New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain." Trends Neurosci **26**(10): 523-30.
- Nicolle, M. M., J. L. Bizon and M. Gallagher (1996). "In vitro autoradiography of ionotropic glutamate receptors in hippocampus and striatum of aged Long-Evans rats: relationship to spatial learning." Neuroscience **74**(3): 741-56.
- Nieto-Sampedro, M. and M. Nieto-Diaz (2005). "Neural plasticity: changes with age." J Neural Transm **112**(1): 3-27.
- Nilserth, C., A. Westlind-Danielsson, C. B. Eckman, et al. (2001). "The 'Arctic' APP mutation (E693G) causes Alzheimer's disease by enhanced Abeta protofibril formation." Nat Neurosci **4**(9): 887-93.
- Nilsson, M., E. Perfilieva, U. Johansson, et al. (1999). "Enriched environment increases neurogenesis in the adult rat dentate gyrus and improves spatial memory." J Neurobiol **39**(4): 569-78.

- Nolan, T., R. E. Hands and S. A. Bustin (2006). "Quantification of mRNA using real-time RT-PCR." Nat Protoc **1**(3): 1559-82.
- Norum, K. R. (1992). "Dietary fat and blood lipids." Nutr Rev **50**(4 (Pt 2)): 30-7.
- Norum, K. R. and R. Blomhoff (1992). "McCullum Award Lecture, 1992: vitamin A absorption, transport, cellular uptake, and storage." Am J Clin Nutr **56**(4): 735-44.
- Novac, N. and T. Heinzel (2004). "Nuclear receptors: overview and classification." Curr Drug Targets Inflamm Allergy **3**(4): 335-46.
- Nowotny, P., A. L. Hinrichs, S. Smemo, et al. (2005). "Association studies between risk for late-onset Alzheimer's disease and variants in insulin degrading enzyme." Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet **136B**(1): 62-8.
- Nussbaum, R. L. and C. E. Ellis (2003). "Alzheimer's disease and Parkinson's disease." N Engl J Med **348**(14): 1356-64.

## O

- O'Barr, S. A., J. S. Oh, C. Ma, et al. (2006). "Thyroid hormone regulates endogenous amyloid-beta precursor protein gene expression and processing in both in vitro and in vivo models." Thyroid **16**(12): 1207-13.
- O'Kusky, J. and M. Colonnier (1982). "A laminar analysis of the number of neurons, glia, and synapses in the adult cortex (area 17) of adult macaque monkeys." J Comp Neurol **210**(3): 278-90.
- O'Kusky, J. and M. Colonnier (1982). "Postnatal changes in the number of astrocytes, oligodendrocytes, and microglia in the visual cortex (area 17) of the macaque monkey: a stereological analysis in normal and monocularly deprived animals." J Comp Neurol **210**(3): 307-15.
- O'Malley, B. (1990). "The steroid receptor superfamily: more excitement predicted for the future." Mol Endocrinol **4**(3): 363-9.
- O'Reilly, K. C., J. Shumake, F. Gonzalez-Lima, et al. (2006). "Chronic administration of 13-cis-retinoic acid increases depression-related behavior in mice." Neuropsychopharmacology **31**(9): 1919-27.
- Oberg, J., C. Spenger, F. H. Wang, et al. (2008). "Age related changes in brain metabolites observed by 1H MRS in APP/PS1 mice." Neurobiol Aging **29**(9): 1423-33.
- Oddo, S., A. Caccamo, J. D. Shephard, et al. (2003). "Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction." Neuron **39**(3): 409-21.
- Oja, S. S. and P. Saransaari (1996). "Taurine as osmoregulator and neuromodulator in the brain." Metab Brain Dis **11**(2): 153-64.
- Okamura, K., A. Taurog and L. Krulich (1981). "Hypothyroidism in severely iodine-deficient rats." Endocrinology **109**(2): 464-8.
- Olariu, A., K. M. Cleaver and H. A. Cameron (2007). "Decreased neurogenesis in aged rats results from loss of granule cell precursors without lengthening of the cell cycle." J Comp Neurol **501**(4): 659-67.
- Olefsky, J. M. (2001). "Nuclear receptor minireview series." J Biol Chem **276**(40): 36863-4.
- Oliveira, J. M. and P. H. Rondo (2007). "[Evidence of the impact of vitamin A supplementation on maternal and child health]." Cad Saude Publica **23**(11): 2565-75.
- Ono, K., Y. Yoshiike, A. Takashima, et al. (2004). "Vitamin A exhibits potent anti-amyloidogenic and fibril-destabilizing effects in vitro." Exp Neurol **189**(2): 380-92.
- Opazo, C., X. Huang, R. A. Cherny, et al. (2002). "Metalloenzyme-like activity of Alzheimer's disease beta-amyloid. Cu-dependent catalytic conversion of dopamine, cholesterol, and biological reducing agents to neurotoxic H(2)O(2)." J Biol Chem **277**(43): 40302-8.

- Opstad, K. S., B. A. Bell, J. R. Griffiths, et al. (2008). "An investigation of human brain tumour lipids by high-resolution magic angle spinning 1H MRS and histological analysis." *NMR Biomed* **21**(7): 677-85.
- Orgogozo, J. M., J. F. Dartigues, S. Lafont, et al. (1997). "Wine consumption and dementia in the elderly: a prospective community study in the Bordeaux area." *Rev Neurol (Paris)* **153**(3): 185-92.
- Otto, T. and H. Eichenbaum (1992). "Neuronal activity in the hippocampus during delayed non-match to sample performance in rats: evidence for hippocampal processing in recognition memory." *Hippocampus* **2**(3): 323-34.

<b>P</b>
----------

- Paik, J., S. Vogel, L. Quadro, et al. (2004). "Vitamin A: overlapping delivery pathways to tissues from the circulation." *J Nutr* **134**(1): 276S-280S.
- Pak, J. H., F. L. Huang, J. Li, et al. (2000). "Involvement of neurogranin in the modulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, synaptic plasticity, and spatial learning: a study with knockout mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(21): 11232-7.
- Pakaski, M. and J. Kalman (2008). "Interactions between the amyloid and cholinergic mechanisms in Alzheimer's disease." *Neurochem Int* **53**(5): 103-11.
- Pallet, V., I. Audouin-Chevallier, C. Verret, et al. (1994). "Retinoic acid differentially modulates triiodothyronine and retinoic acid receptors in rat liver according to thyroid status." *Eur J Endocrinol* **131**(4): 377-84.
- Pallet, V., V. Azais-Braesco, V. Enderlin, et al. (1997). "Aging decreases retinoic acid and triiodothyronine nuclear expression in rat liver: exogenous retinol and retinoic acid differentially modulate this decreased expression." *Mech Ageing Dev* **99**(2): 123-36.
- Palmer, T. D., J. Takahashi and F. H. Gage (1997). "The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells." *Mol Cell Neurosci* **8**(6): 389-404.
- Pan, J. B., L. M. Monteggia and T. Giordano (1993). "Altered levels and splicing of the amyloid precursor protein in the adult rat hippocampus after treatment with DMSO or retinoic acid." *Molecular Brain Research* **18**(3): 259.
- Parisotto, M., H. Brodeur, P. V. Bhat, et al. (2006). "[Retinoid metabolism and cancer]." *Med Sci (Paris)* **22**(12): 1101-6.
- Pasantes-Morales, H. and A. Schousboe (1989). "Release of taurine from astrocytes during potassium-evoked swelling." *Glia* **2**(1): 45-50.
- Perez, A., L. Morelli, J. C. Cresto, et al. (2000). "Degradation of soluble amyloid beta-peptides 1-40, 1-42, and the Dutch variant 1-40Q by insulin degrading enzyme from Alzheimer disease and control brains." *Neurochem Res* **25**(2): 247-55.
- Perissi, V. and M. G. Rosenfeld (2005). "Controlling nuclear receptors: the circular logic of cofactor cycles." *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(7): 542-54.
- Perrig, W. J., P. Perrig and H. B. Stahelin (1997). "The relation between antioxidants and memory performance in the old and very old." *J Am Geriatr Soc* **45**(6): 718-24.
- Perry, R. J. and J. R. Hodges (1999). "Attention and executive deficits in Alzheimer's disease. A critical review." *Brain* **122** (Pt 3): 383-404.
- Petersen, R. B., A. Nunomura, H. G. Lee, et al. (2007). "Signal transduction cascades associated with oxidative stress in Alzheimer's disease." *J Alzheimers Dis* **11**(2): 143-52.
- Petkovich, M., N. J. Brand, A. Krust, et al. (1987). "A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors." *Nature* **330**(6147): 444-50.
- Pfahl, M. and F. Chytil (1996). "Regulation of metabolism by retinoic acid and its nuclear receptors." *Annu Rev Nutr* **16**: 257-83.

- Placanica, L., L. Tarassishin, G. Yang, et al. (2009). "Pen2 and presenilin-1 modulate the dynamic equilibrium of presenilin-1 and presenilin-2 gamma-secretase complexes." *J Biol Chem* **284**(5): 2967-77.
- Podewils, L. J., E. Guallar, L. H. Kuller, et al. (2005). "Physical activity, APOE genotype, and dementia risk: findings from the Cardiovascular Health Cognition Study." *Am J Epidemiol* **161**(7): 639-51.
- Ponten, U., R. A. Ratcheson, L. G. Salford, et al. (1973). "Optimal freezing conditions for cerebral metabolites in rats." *J Neurochem* **21**(5): 1127-38.
- Poole T, E. P. (1999). UFAW guidelines Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals. Oxford.
- Postina, R., A. Schroeder, I. Dewachter, et al. (2004). "A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model." *J Clin Invest* **113**(10): 1456-64.
- Pratico, D., K. Uryu, S. Leight, et al. (2001). "Increased lipid peroxidation precedes amyloid plaque formation in an animal model of Alzheimer amyloidosis." *J Neurosci* **21**(12): 4183-7.
- Preece, P., D. J. Virley, M. Costandi, et al. (2004). "Amyloid precursor protein mRNA levels in Alzheimer's disease brain." *Brain Res Mol Brain Res* **122**(1): 1-9.
- Price, D. L., R. E. Tanzi, D. R. Borchelt, et al. (1998). "Alzheimer's disease: genetic studies and transgenic models." *Annu Rev Genet* **32**: 461-93.
- Priller, C., T. Bauer, G. Mitteregger, et al. (2006). "Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein." *J Neurosci* **26**(27): 7212-21.
- Prinzen, C., U. Muller, K. Endres, et al. (2005). "Genomic structure and functional characterization of the human ADAM10 promoter." *Faseb J* **19**(11): 1522-4.
- Pulsatelli, L., R. Meliconi, I. Mazzetti, et al. (2000). "Chemokine production by peripheral blood mononuclear cells in elderly subjects." *Mech Ageing Dev* **121**(1-3): 89-100.

<b>R</b>
----------

- Raber, J., D. Wong, M. Buttini, et al. (1998). "Isoform-specific effects of human apolipoprotein E on brain function revealed in ApoE knockout mice: increased susceptibility of females." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(18): 10914-9.
- Rabeson, H., F. Fauvelle, G. Testylier, et al. (2008). "Quantitation with QUEST of brain HRMAS-NMR signals: application to metabolic disorders in experimental epileptic seizures." *Magn Reson Med* **59**(6): 1266-73.
- Ramaroson, H., C. Helmer, P. Barberger-Gateau, et al. (2003). "[Prevalence of dementia and Alzheimer's disease among subjects aged 75 years or over: updated results of the PAQUID cohort]." *Rev Neurol (Paris)* **159**(4): 405-11.
- Ramin, S. L., W. A. Tognola and A. R. Spotti (2003). "Proton magnetic resonance spectroscopy: clinical applications in patients with brain lesions." *Sao Paulo Med J* **121**(6): 254-9.
- Rastinejad, F. (2001). "Retinoid X receptor and its partners in the nuclear receptor family." *Curr Opin Struct Biol* **11**(1): 33-8.
- Ratai, E. M., S. Pilkenton, M. R. Lentz, et al. (2005). "Comparisons of brain metabolites observed by HRMAS 1H NMR of intact tissue and solution 1H NMR of tissue extracts in SIV-infected macaques." *NMR Biomed* **18**(4): 242-51.
- Ravaglia, G., P. Forti, F. Maioli, et al. (2000). "Blood micronutrient and thyroid hormone concentrations in the oldest-old." *J Clin Endocrinol Metab* **85**(6): 2260-5.

- Ravaglia, G., P. Forti, F. Maioli, et al. (2000). "Elevated plasma homocysteine levels in centenarians are not associated with cognitive impairment." *Mech Ageing Dev* **121**(1-3): 251-61.
- Ravaglia, G., P. Forti, F. Maioli, et al. (2000). "Blood homocysteine and vitamin B levels are not associated with cognitive skills in healthy normally ageing subjects." *J Nutr Health Aging* **4**(4): 218-22.
- Rebeck, G. W., J. S. Reiter, D. K. Strickland, et al. (1993). "Apolipoprotein E in sporadic Alzheimer's disease: allelic variation and receptor interactions." *Neuron* **11**(4): 575-80.
- Reifen, R. (2002). "Vitamin A as an anti-inflammatory agent." *Proc Nutr Soc* **61**(3): 397-400.
- Reifen, R., T. Nur, K. Ghebermeskel, et al. (2002). "Vitamin A deficiency exacerbates inflammation in a rat model of colitis through activation of nuclear factor-kappaB and collagen formation." *J Nutr* **132**(9): 2743-7.
- Resende, R., P. I. Moreira, T. Proenca, et al. (2008). "Brain oxidative stress in a triple-transgenic mouse model of Alzheimer disease." *Free Radic Biol Med* **44**(12): 2051-7.
- Reynolds, B. A. and S. Weiss (1992). "Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system." *Science* **255**(5052): 1707-10.
- Rigotti, D. J., M. Inglese and O. Gonen (2007). "Whole-brain N-acetylaspartate as a surrogate marker of neuronal damage in diffuse neurologic disorders." *AJNR Am J Neuroradiol* **28**(10): 1843-9.
- Rinaldi, P., M. C. Polidori, A. Metastasio, et al. (2003). "Plasma antioxidants are similarly depleted in mild cognitive impairment and in Alzheimer's disease." *Neurobiol Aging* **24**(7): 915-9.
- Rioux, L. and S. E. Arnold (2005). "The expression of retinoic acid receptor alpha is increased in the granule cells of the dentate gyrus in schizophrenia." *Psychiatry Res* **133**(1): 13-21.
- Roberts, C. G. and P. W. Ladenson (2004). "Hypothyroidism." *Lancet* **363**(9411): 793-803.
- Roriz-Cruz, M., I. Rosset, T. Wada, et al. (2007). "Stroke-independent association between metabolic syndrome and functional dependence, depression, and low quality of life in elderly community-dwelling Brazilian people." *J Am Geriatr Soc* **55**(3): 374-82.
- Rosenzweig, E. S. and C. A. Barnes (2003). "Impact of aging on hippocampal function: plasticity, network dynamics, and cognition." *Prog Neurobiol* **69**(3): 143-79.
- Roses, A. D. (1994). "Apolipoprotein E is a relevant susceptibility gene that affects the rate of expression of Alzheimer's disease." *Neurobiol Aging* **15 Suppl 2**: S165-7.
- Roses, A. D. and A. M. Saunders (1994). "APOE is a major susceptibility gene for Alzheimer's disease." *Curr Opin Biotechnol* **5**(6): 663-7.
- Ross, A. C. (2003). "Retinoid production and catabolism: role of diet in regulating retinol esterification and retinoic Acid oxidation." *J Nutr* **133**(1): 291S-296S.
- Ross, A. C., R. Zolfaghari and J. Weisz (2001). "Vitamin A: recent advances in the biotransformation, transport, and metabolism of retinoids." *Curr Opin Gastroenterol* **17**(2): 184-192.
- Ross, S. A., P. J. McCaffery, U. C. Drager, et al. (2000). "Retinoids in embryonal development." *Physiol Rev* **80**(3): 1021-54.
- Rossi, C., A. Angelucci, L. Costantin, et al. (2006). "Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is required for the enhancement of hippocampal neurogenesis following environmental enrichment." *Eur J Neurosci* **24**(7): 1850-6.
- Routtenberg, A., I. Cantalops, S. Zaffuto, et al. (2000). "Enhanced learning after genetic overexpression of a brain growth protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(13): 7657-62.
- Rovelet-Lecrux, A., D. Hannequin, G. Raux, et al. (2006). "APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy." *Nat Genet* **38**(1): 24-6.

- Rowe, W. B., E. M. Blalock, K. C. Chen, et al. (2007). "Hippocampal expression analyses reveal selective association of immediate-early, neuroenergetic, and myelinogenic pathways with cognitive impairment in aged rats." *J Neurosci* **27**(12): 3098-110.
- Rowe, W. B., E. Spreckmeester, M. J. Meaney, et al. (1998). "Reactivity to novelty in cognitively-impaired and cognitively-unimpaired aged rats and young rats." *Neuroscience* **83**(3): 669-80.
- Rozemuller, A. J., W. A. van Gool and P. Eikelenboom (2005). "The neuroinflammatory response in plaques and amyloid angiopathy in Alzheimer's disease: therapeutic implications." *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* **4**(3): 223-33.
- Ruiz-Leon, Y. and A. Pascual (2003). "Induction of tyrosine kinase receptor b by retinoic acid allows brain-derived neurotrophic factor-induced amyloid precursor protein gene expression in human SH-SY5Y neuroblastoma cells." *Neuroscience* **120**(4): 1019-26.
- Russell, R. M. (2000). "The aging process as a modifier of metabolism." *Am J Clin Nutr* **72**(2 Suppl): 529S-32S.
- Russell, R. M. (2000). "The vitamin A spectrum: from deficiency to toxicity." *Am J Clin Nutr* **71**(4): 878-84.

<b>S</b>
----------

- Sadow, P. M., O. Chassande, K. Gauthier, et al. (2003). "Specificity of thyroid hormone receptor subtype and steroid receptor coactivator-1 on thyroid hormone action." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **284**(1): E36-46.
- Sahin, M., S. B. Karauzum, G. Perry, et al. (2005). "Retinoic acid isomers protect hippocampal neurons from amyloid-beta induced neurodegeneration." *Neurotox Res* **7**(3): 243-50.
- Saido, T. C., W. Yamao-Harigaya, T. Iwatsubo, et al. (1996). "Amino- and carboxyl-terminal heterogeneity of beta-amyloid peptides deposited in human brain." *Neurosci Lett* **215**(3): 173-6.
- Sakai, Y., J. E. Crandall, J. Brodsky, et al. (2004). "13-cis Retinoic acid (accutane) suppresses hippocampal cell survival in mice." *Ann N Y Acad Sci* **1021**: 436-40.
- Salehi, A., J. D. Delcroix and D. F. Swaab (2004). "Alzheimer's disease and NGF signaling." *J Neural Transm* **111**(3): 323-45.
- Sampaolo, S., A. Campos-Barros, G. Mazziotti, et al. (2005). "Increased cerebrospinal fluid levels of 3,3',5'-triiodothyronine in patients with Alzheimer's disease." *J Clin Endocrinol Metab* **90**(1): 198-202.
- Sandi, C. and K. Touyarot (2006). "Mid-life stress and cognitive deficits during early aging in rats: individual differences and hippocampal correlates." *Neurobiol Aging* **27**(1): 128-40.
- Sanno, N., A. Sugawara, A. Teramoto, et al. (1997). "Immunohistochemical expression of retinoid X receptor isoforms in human pituitaries and pituitary adenomas." *Neuroendocrinology* **65**(4): 299-306.
- Sastre, M., I. Dewachter, S. Rossner, et al. (2006). "Nonsteroidal anti-inflammatory drugs repress beta-secretase gene promoter activity by the activation of PPARgamma." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(2): 443-8.
- Sastre, M., T. Klockgether and M. T. Heneka (2006). "Contribution of inflammatory processes to Alzheimer's disease: molecular mechanisms." *Int J Dev Neurosci* **24**(2-3): 167-76.
- Satoh, J. and Y. Kuroda (2000). "Amyloid precursor protein beta-secretase (BACE) mRNA expression in human neural cell lines following induction of neuronal differentiation and exposure to cytokines and growth factors." *Neuropathology* **20**(4): 289-96.

- Saunders, A. M., W. J. Strittmatter, D. Schmechel, et al. (1993). "Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease." Neurology **43**(8): 1467-72.
- Scharfman, H., J. Goodman, A. Macleod, et al. (2005). "Increased neurogenesis and the ectopic granule cells after intrahippocampal BDNF infusion in adult rats." Exp Neurol **192**(2): 348-56.
- Schinder, A. F. and F. H. Gage (2004). "A hypothesis about the role of adult neurogenesis in hippocampal function." Physiology (Bethesda) **19**: 253-61.
- Schmidt-Hieber, C., P. Jonas and J. Bischofberger (2004). "Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus." Nature **429**(6988): 184-7.
- Schneider, E. L. (1999). "Aging in the third millennium." Science **283**(5403): 796-7.
- Schrader, M. and C. Carlberg (1994). "Thyroid hormone and retinoic acid receptors form heterodimers with retinoid X receptors on direct repeats, palindromes, and inverted palindromes." DNA Cell Biol **13**(4): 333-41.
- Scott, S. A., E. J. Mufson, J. A. Weingartner, et al. (1995). "Nerve growth factor in Alzheimer's disease: increased levels throughout the brain coupled with declines in nucleus basalis." J Neurosci **15**(9): 6213-21.
- Scoville, W. B. and B. Milner (1957). "Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions." J Neurol Neurosurg Psychiatry **20**(1): 11-21.
- Sei, H. (2008). "Vitamin A and sleep regulation." J Med Invest **55**(1-2): 1-8.
- Seki, T. and Y. Arai (1995). "Age-related production of new granule cells in the adult dentate gyrus." Neuroreport **6**(18): 2479-82.
- Selkoe, D. J. (2001). "Alzheimer's disease results from the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein." J Alzheimers Dis **3**(1): 75-80.
- Selkoe, D. J. (2002). "Alzheimer's disease is a synaptic failure." Science **298**(5594): 789-91.
- Sergeant, N., A. Delacourte and L. Buee (2005). "Tau protein as a differential biomarker of tauopathies." Biochim Biophys Acta **1739**(2-3): 179-97.
- Seri, B., J. M. Garcia-Verdugo, B. S. McEwen, et al. (2001). "Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus." J Neurosci **21**(18): 7153-60.
- Seux, M. L., L. Thijs, F. Forette, et al. (1998). "Correlates of cognitive status of old patients with isolated systolic hypertension: the Syst-Eur Vascular Dementia Project." J Hypertens **16**(7): 963-9.
- Shankar, G. M., B. L. Bloodgood, M. Townsend, et al. (2007). "Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway." J Neurosci **27**(11): 2866-75.
- Shapiro, M. L. and H. Eichenbaum (1999). "Hippocampus as a memory map: synaptic plasticity and memory encoding by hippocampal neurons." Hippocampus **9**(4): 365-84.
- Shen, J., C. A. Barnes, B. L. McNaughton, et al. (1997). "The effect of aging on experience-dependent plasticity of hippocampal place cells." J Neurosci **17**(17): 6769-82.
- Shen, Y., S. Mani, S. L. Donovan, et al. (2002). "Growth-associated protein-43 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system." J Neurosci **22**(1): 239-47.
- Shihabuddin, L. S., P. J. Horner, J. Ray, et al. (2000). "Adult spinal cord stem cells generate neurons after transplantation in the adult dentate gyrus." J Neurosci **20**(23): 8727-35.
- Shoji, M., T. E. Golde, J. Ghiso, et al. (1992). "Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing." Science **258**(5079): 126-9.
- Sian, J., D. T. Dexter, A. J. Lees, et al. (1994). "Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia." Ann Neurol **36**(3): 348-55.



- Sian, J., D. T. Dexter, A. J. Lees, et al. (1994). "Glutathione-related enzymes in brain in Parkinson's disease." *Ann Neurol* **36**(3): 356-61.
- Silva, A. J. (2003). "Molecular and cellular cognitive studies of the role of synaptic plasticity in memory." *J Neurobiol* **54**(1): 224-37.
- Simmons, M. L., C. G. Frondoza and J. T. Coyle (1991). "Immunocytochemical localization of N-acetyl-aspartate with monoclonal antibodies." *Neuroscience* **45**(1): 37-45.
- Singec, I., R. Knoth, M. Ditter, et al. (2004). "Neurogranin is expressed by principal cells but not interneurons in the rodent and monkey neocortex and hippocampus." *J Comp Neurol* **479**(1): 30-42.
- Singer, C. A., P. J. McMillan, D. J. Dobie, et al. (1998). "Effects of estrogen replacement on choline acetyltransferase and trkA mRNA expression in the basal forebrain of aged rats." *Brain Res* **789**(2): 343-6.
- Singh, M., M. Arseneault, T. Sanderson, et al. (2008). "Challenges for research on polyphenols from foods in Alzheimer's disease: bioavailability, metabolism, and cellular and molecular mechanisms." *J Agric Food Chem* **56**(13): 4855-73.
- Skoog, I., B. Lernfelt, S. Landahl, et al. (1996). "15-year longitudinal study of blood pressure and dementia." *Lancet* **347**(9009): 1141-5.
- Sladek, F. M., M. D. Ruse, Jr., L. Nepomuceno, et al. (1999). "Modulation of transcriptional activation and coactivator interaction by a splicing variation in the F domain of nuclear receptor hepatocyte nuclear factor 4alpha1." *Mol Cell Biol* **19**(10): 6509-22.
- Slomnicki, L. P. and W. Lesniak (2008). "A putative role of the Amyloid Precursor Protein Intracellular Domain (AICD) in transcription." *Acta Neurobiol Exp (Wars)* **68**(2): 219-28.
- Smith, A. D. (1972). "Storage and secretion of hormones." *Sci Basis Med Annu Rev*: 74-102.
- Smith, G. F. and J. L. Sundboom (1984). "The effects of 1-methyl-5-thiotetrazole in a rat liver vitamin K-dependent carboxylase assay." *Thromb Res* **33**(6): 633-44.
- Smith, J. W., A. T. Evans, B. Costall, et al. (2002). "Thyroid hormones, brain function and cognition: a brief review." *Neurosci Biobehav Rev* **26**(1): 45-60.
- Smith, M. A. and G. Perry (1998). "What are the facts and artifacts of the pathogenesis and etiology of Alzheimer disease?" *J Chem Neuroanat* **16**(1): 35-41.
- Snyder, J. S., N. S. Hong, R. J. McDonald, et al. (2005). "A role for adult neurogenesis in spatial long-term memory." *Neuroscience* **130**(4): 843-52.
- Snyder, J. S., N. Kee and J. M. Wojtowicz (2001). "Effects of adult neurogenesis on synaptic plasticity in the rat dentate gyrus." *J Neurophysiol* **85**(6): 2423-31.
- Sola, C., G. Mengod, A. Probst, et al. (1993). "Differential regional and cellular distribution of beta-amyloid precursor protein messenger RNAs containing and lacking the Kunitz protease inhibitor domain in the brain of human, rat and mouse." *Neuroscience* **53**(1): 267-95.
- Solis, J. M., A. S. Herranz, O. Herreras, et al. (1988). "Does taurine act as an osmoregulatory substance in the rat brain?" *Neurosci Lett* **91**(1): 53-8.
- Sommer, A. (1995). "Vitamin A deficiency and its consequences: a field guide to their detection and control." *World Health Organization*.
- Song, E. S. and L. B. Hersh (2005). "Insulysin: an allosteric enzyme as a target for Alzheimer's disease." *J Mol Neurosci* **25**(3): 201-6.
- Spinella, M. J., J. S. Kerley, K. A. White, et al. (2003). "Retinoid target gene activation during induced tumor cell differentiation: human embryonal carcinoma as a model." *J Nutr* **133**(1): 273S-276S.
- Spittaels, K., C. Van den Haute, J. Van Dorpe, et al. (1999). "Prominent axonopathy in the brain and spinal cord of transgenic mice overexpressing four-repeat human tau protein." *Am J Pathol* **155**(6): 2153-65.
- Sporn, M. B., A. B. Roberts and D. S. Goodman (1994). "The Retinoids: biology, chemistry, and medicine." *New York, Raven Press*.

- Squire, L. R. (1992). "Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans." Psychol Rev **99**(2): 195-231.
- Stancampiano, R., M. Carta and F. Fadda (2007). "Vitamin A deficiency affects neither frontocortical acetylcholine nor working memory." Neuroreport **18**(3): 241-3.
- Steiner, H., R. Fluhrer and C. Haass (2008). "Intramembrane proteolysis by gamma-secretase." J Biol Chem **283**(44): 29627-31.
- Steiner, H., E. Winkler, D. Edbauer, et al. (2002). "PEN-2 is an integral component of the gamma-secretase complex required for coordinated expression of presenilin and nicastrin." J Biol Chem **277**(42): 39062-5.
- Stranahan, A. M., D. Khalil and E. Gould (2006). "Social isolation delays the positive effects of running on adult neurogenesis." Nat Neurosci **9**(4): 526-33.
- Strittmatter, W. J., A. M. Saunders, D. Schmechel, et al. (1993). "Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(5): 1977-81.
- Strittmatter, W. J., K. H. Weisgraber, M. Goedert, et al. (1994). "Hypothesis: microtubule instability and paired helical filament formation in the Alzheimer disease brain are related to apolipoprotein E genotype." Exp Neurol **125**(2): 163-71; discussion 172-4.
- Sugerman, S. B., S. Mobarhan, P. E. Bowen, et al. (1991). "Serum time curve characteristics of a fixed dose of beta-carotene in young and old men." J Am Coll Nutr **10**(4): 297-307.
- Sugimoto, H. (2008). "The new approach in development of anti-Alzheimer's disease drugs via the cholinergic hypothesis." Chem Biol Interact **175**(1-3): 204-8.
- Sui, L., F. Wang and B. M. Li (2006). "Adult-onset hypothyroidism impairs paired-pulse facilitation and long-term potentiation of the rat dorsal hippocampo-medial prefrontal cortex pathway in vivo." Brain Res **1096**(1): 53-60.
- Sun, L. Y., M. S. Evans, J. Hsieh, et al. (2005). "Increased neurogenesis in dentate gyrus of long-lived Ames dwarf mice." Endocrinology **146**(3): 1138-44.
- Sundboom, J. and J. A. Olson (1984). "Effect of aging on the storage and catabolism of vitamin A in mice." Exp Gerontol **19**(4): 257-65.
- Suzuki, S., T. Miyamoto, A. Opsahl, et al. (1994). "Two thyroid hormone response elements are present in the promoter of human thyroid hormone receptor beta 1." Mol Endocrinol **8**(3): 305-14.
- Szanto, A., V. Narkar, Q. Shen, et al. (2004). "Retinoid X receptors: X-ploring their (patho)physiological functions." Cell Death Differ **11 Suppl 2**: S126-43.

<b>T</b>
----------

- Tafti, M. and N. B. Ghyselinck (2007). "Functional implication of the vitamin A signaling pathway in the brain." Arch Neurol **64**(12): 1706-11.
- Takahashi, J., T. D. Palmer and F. H. Gage (1999). "Retinoic acid and neurotrophins collaborate to regulate neurogenesis in adult-derived neural stem cell cultures." J Neurobiol **38**(1): 65-81.
- Takasugi, N., T. Tomita, I. Hayashi, et al. (2003). "The role of presenilin cofactors in the gamma-secretase complex." Nature **422**(6930): 438-41.
- Tesco, G., Y. H. Koh, E. L. Kang, et al. (2007). "Depletion of GGA3 stabilizes BACE and enhances beta-secretase activity." Neuron **54**(5): 721-37.
- Tesseur, I., J. Van Dorpe, K. Spittaels, et al. (2000). "Expression of human apolipoprotein E4 in neurons causes hyperphosphorylation of protein tau in the brains of transgenic mice." Am J Pathol **156**(3): 951-64.
- Thal, D. R. and H. Braak (2005). "[Post-mortem diagnosis of Alzheimer's disease]." Pathologie **26**(3): 201-13.

- Thal, D. R., E. Capetillo-Zarate, K. Del Tredici, et al. (2006). "The development of amyloid beta protein deposits in the aged brain." *Sci Aging Knowledge Environ* **2006**(6): re1.
- Thal, D. R., U. Rub, M. Orantes, et al. (2002). "Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD." *Neurology* **58**(12): 1791-800.
- Thal, D. R., U. Rub, C. Schultz, et al. (2000). "Sequence of Abeta-protein deposition in the human medial temporal lobe." *J Neuropathol Exp Neurol* **59**(8): 733-48.
- Thompson Haskell, G., T. M. Maynard, R. A. Shatzmiller, et al. (2002). "Retinoic acid signaling at sites of plasticity in the mature central nervous system." *J Comp Neurol* **452**(3): 228-41.
- Tickler, A. K., D. G. Smith, G. D. Ciccotosto, et al. (2005). "Methylation of the imidazole side chains of the Alzheimer disease amyloid-beta peptide results in abolition of superoxide dismutase-like structures and inhibition of neurotoxicity." *J Biol Chem* **280**(14): 13355-63.
- Tickler, A. K., J. D. Wade and F. Separovic (2005). "The role of Abeta peptides in Alzheimer's disease." *Protein Pept Lett* **12**(6): 513-9.
- Tippmann, F., J. Hundt, A. Schneider, et al. (2009). "Up-regulation of the {alpha}-secretase ADAM10 by retinoic acid receptors and acitretin." *Faseb J*.
- Toescu, E. C., A. Verkhratsky and P. W. Landfield (2004). "Ca<sup>2+</sup> regulation and gene expression in normal brain aging." *Trends Neurosci* **27**(10): 614-20.
- Turner, P. R., K. O'Connor, W. P. Tate, et al. (2003). "Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory." *Prog Neurobiol* **70**(1): 1-32.
- Tuszynski, M. H., H. S. U, J. Alksne, et al. (2002). "Growth factor gene therapy for Alzheimer disease." *Neurosurg Focus* **13**(5): e5.
- Tzourio, C. (2007). "Hypertension, cognitive decline, and dementia: an epidemiological perspective." *Dialogues Clin Neurosci* **9**(1): 61-70.

<b>U</b>
----------

- Uchida, K., M. Yonezawa, S. Nakamura, et al. (2005). "Impaired neurogenesis in the growth-retarded mouse is reversed by T3 treatment." *Neuroreport* **16**(2): 103-6.
- Umesono, K., K. K. Murakami, C. C. Thompson, et al. (1991). "Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D3 receptors." *Cell* **65**(7): 1255-66.
- Uttl, B. and P. Graf (1993). "Episodic spatial memory in adulthood." *Psychol Aging* **8**(2): 257-73.
- Uylings, H. B. and J. M. de Brabander (2002). "Neuronal changes in normal human aging and Alzheimer's disease." *Brain Cogn* **49**(3): 268-76.

<b>V</b>
----------

- Vallortigara, J., S. Alfons, J. Micheau, et al. (2008). "T3 administration in adult hypothyroid mice modulates expression of proteins involved in striatal synaptic plasticity and improves motor behavior." *Neurobiol Dis* **31**(3): 378-85.
- van Bennekum, A. M., S. Wei, M. V. Gamble, et al. (2001). "Biochemical basis for depressed serum retinol levels in transthyretin-deficient mice." *J Biol Chem* **276**(2): 1107-13.

- van Boxtel, M. P., P. P. Menheere, O. Bekers, et al. (2004). "Thyroid function, depressed mood, and cognitive performance in older individuals: the Maastricht Aging Study." Psychoneuroendocrinology **29**(7): 891-8.
- Van der Borght, K., A. E. Wallinga, P. G. Luiten, et al. (2005). "Morris water maze learning in two rat strains increases the expression of the polysialylated form of the neural cell adhesion molecule in the dentate gyrus but has no effect on hippocampal neurogenesis." Behav Neurosci **119**(4): 926-32.
- van der Loo, B., R. Labugger, C. P. Aebischer, et al. (2004). "Age-related changes of vitamin A status." J Cardiovasc Pharmacol **43**(1): 26-30.
- Vara, H., B. Martinez, A. Santos, et al. (2002). "Thyroid hormone regulates neurotransmitter release in neonatal rat hippocampus." Neuroscience **110**(1): 19-28.
- Varju, P., Z. Katarova, E. Madarasz, et al. (2002). "Sequential induction of embryonic and adult forms of glutamic acid decarboxylase during in vitro-induced neurogenesis in cloned neuroectodermal cell-line, NE-7C2." J Neurochem **80**(4): 605-15.
- Vassar, R. (2004). "BACE1: the beta-secretase enzyme in Alzheimer's disease." J Mol Neurosci **23**(1-2): 105-14.
- Vekrellis, K., Z. Ye, W. Q. Qiu, et al. (2000). "Neurons regulate extracellular levels of amyloid beta-protein via proteolysis by insulin-degrading enzyme." J Neurosci **20**(5): 1657-65.
- Verbitsky, M., A. L. Yonan, G. Malleret, et al. (2004). "Altered hippocampal transcript profile accompanies an age-related spatial memory deficit in mice." Learn Mem **11**(3): 253-60.
- Verma, A. K., A. Shoemaker, R. Simsiman, et al. (1992). "Expression of retinoic acid nuclear receptors and tissue transglutaminase is altered in various tissues of rats fed a vitamin A-deficient diet." J Nutr **122**(11): 2144-52.
- Verret, L., J. L. Jankowsky, G. M. Xu, et al. (2007). "Alzheimer's-type amyloidosis in transgenic mice impairs survival of newborn neurons derived from adult hippocampal neurogenesis." J Neurosci **27**(25): 6771-80.
- Vickers, J. C., T. C. Dickson, P. A. Adlard, et al. (2000). "The cause of neuronal degeneration in Alzheimer's disease." Prog Neurobiol **60**(2): 139-65.
- Villa, A., J. Santiago, B. Belandia, et al. (2004). "A response unit in the first exon of the beta-amyloid precursor protein gene containing thyroid hormone receptor and Sp1 binding sites mediates negative regulation by 3,5,3'-triiodothyronine." Mol Endocrinol **18**(4): 863-73.
- Vingtdeux, V., M. Hamdane, M. Gompel, et al. (2005). "Phosphorylation of amyloid precursor carboxy-terminal fragments enhances their processing by a gamma-secretase-dependent mechanism." Neurobiol Dis **20**(2): 625-37.
- Vivat-Hannah, V. and F. C. Zusi (2005). "Retinoids as therapeutic agents: today and tomorrow." Mini Rev Med Chem **5**(8): 755-60.
- von Bohlen und Halbach, O., C. Zacher, P. Gass, et al. (2006). "Age-related alterations in hippocampal spines and deficiencies in spatial memory in mice." J Neurosci Res **83**(4): 525-31.
- von Holst, A., A. Rodriguez-Tebar, J. J. Michaille, et al. (1995). "Retinoic acid-mediated increase in TrkA expression is sufficient to elicit NGF-dependent survival of sympathetic neurons." Mol Cell Neurosci **6**(3): 185-98.
- von Rotz, R. C., B. M. Kohli, J. Bosset, et al. (2004). "The APP intracellular domain forms nuclear multiprotein complexes and regulates the transcription of its own precursor." J Cell Sci **117**(Pt 19): 4435-48.

- Wagner, E., T. Luo and U. C. Drager (2002). "Retinoic acid synthesis in the postnatal mouse brain marks distinct developmental stages and functional systems." Cereb Cortex **12**(12): 1244-53.
- Wallace, J. E., E. E. Krauter and B. A. Campbell (1980). "Animal models of declining memory in the aged: short-term and spatial memory in the aged rat." J Gerontol **35**(3): 355-63.
- Walsh, D. M., I. Klyubin, J. V. Fadeeva, et al. (2002). "Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo." Nature **416**(6880): 535-9.
- Walsh, D. M., A. M. Minogue, C. Sala Frigerio, et al. (2007). "The APP family of proteins: similarities and differences." Biochem Soc Trans **35**(Pt 2): 416-20.
- Walsh, D. M. and D. J. Selkoe (2007). "A beta oligomers - a decade of discovery." J Neurochem **101**(5): 1172-84.
- Walsh, S. and P. S. Aisen (2004). "Inflammatory processes and Alzheimer's disease." Expert Rev Neurother **4**(5): 793-8.
- Wan, Y. J. (1993). "Retinoic acid and its receptors." Am J Surg **166**(1): 50-3.
- Wan, Y. J., L. Wang and T. C. Wu (1994). "The expression of retinoid X receptor genes is regulated by all-trans- and 9-cis-retinoic acid in F9 teratocarcinoma cells." Exp Cell Res **210**(1): 56-61.
- Wang, J., L. Ho, Z. Zhao, et al. (2006). "Moderate consumption of Cabernet Sauvignon attenuates Abeta neuropathology in a mouse model of Alzheimer's disease." Faseb J **20**(13): 2313-20.
- Wang, T. W., H. Zhang and J. M. Parent (2005). "Retinoic acid regulates postnatal neurogenesis in the murine subventricular zone-olfactory bulb pathway." Development **132**(12): 2721-32.
- Wang, X. C., X. X. Du, Q. Tian, et al. (2008). "Correlation between choline signal intensity and acetylcholine level in different brain regions of rat." Neurochem Res **33**(5): 814-9.
- Wang, Y., L. Wang, J. Wu, et al. (2006). "The in vivo synaptic plasticity mechanism of EGb 761-induced enhancement of spatial learning and memory in aged rats." Br J Pharmacol **148**(2): 147-53.
- Watson, J. B., I. Szijan and P. M. Coulter, 2nd (1994). "Localization of RC3 (neurogranin) in rat brain subcellular fractions." Brain Res Mol Brain Res **27**(2): 323-8.
- Weingarten, M. D., A. H. Lockwood, S. Y. Hwo, et al. (1975). "A protein factor essential for microtubule assembly." Proc Natl Acad Sci U S A **72**(5): 1858-62.
- Werner, E. A. and H. F. Deluca (2002). "Retinoic acid is detected at relatively high levels in the CNS of adult rats." Am J Physiol Endocrinol Metab **282**(3): E672-8.
- White, J. C., M. Highland, M. Kaiser, et al. (2000). "Vitamin A deficiency results in the dose-dependent acquisition of anterior character and shortening of the caudal hindbrain of the rat embryo." Dev Biol **220**(2): 263-84.
- White, N. M. and R. J. McDonald (2002). "Multiple parallel memory systems in the brain of the rat." Neurobiol Learn Mem **77**(2): 125-84.
- Wietrzyk, M., H. Meziane, A. Sutter, et al. (2005). "Working memory deficits in retinoid X receptor gamma-deficient mice." Learn Mem **12**(3): 318-26.
- Winterbourn, C. C. and D. Metodiewa (1994). "The reaction of superoxide with reduced glutathione." Arch Biochem Biophys **314**(2): 284-90.
- Wirak, D. O., R. Bayney, C. A. Kundel, et al. (1991). "Regulatory region of human amyloid precursor protein (APP) gene promotes neuron-specific gene expression in the CNS of transgenic mice." Embo J **10**(2): 289-96.
- Wirths, O., J. Weis, R. Kaye, et al. (2007). "Age-dependent axonal degeneration in an Alzheimer mouse model." Neurobiol Aging **28**(11): 1689-99.
- Wirths, O., J. Weis, J. Szczygielski, et al. (2006). "Axonopathy in an APP/PS1 transgenic mouse model of Alzheimer's disease." Acta Neuropathol **111**(4): 312-9.

- Wischik, C. M., M. Novak, H. C. Thogersen, et al. (1988). "Isolation of a fragment of tau derived from the core of the paired helical filament of Alzheimer disease." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(12): 4506-10.
- Wohl, C. A. and S. Weiss (1998). "Retinoic acid enhances neuronal proliferation and astroglial differentiation in cultures of CNS stem cell-derived precursors." J Neurobiol **37**(2): 281-90.
- Wolfe, M. S. and C. Haass (2001). "The Role of presenilins in gamma-secretase activity." J Biol Chem **276**(8): 5413-6.
- Wolfe, M. S., W. Xia, B. L. Ostaszewski, et al. (1999). "Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity." Nature **398**(6727): 513-7.
- Wood, E. R. and P. A. Dudchenko (2003). "Aging, spatial behavior and the cognitive map." Nat Neurosci **6**(6): 546-8.
- Wood, J. G., S. S. Mirra, N. J. Pollock, et al. (1986). "Neurofibrillary tangles of Alzheimer disease share antigenic determinants with the axonal microtubule-associated protein tau (tau)." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(11): 4040-3.
- Wu, G., Y. Fang, Z. H. Lu, et al. (1998). "Induction of axon-like and dendrite-like processes in neuroblastoma cells." J Neurocytol **27**(1): 1-14.

<b>X</b>
----------

- Xia, W. (2000). "Role of presenilin in gamma-secretase cleavage of amyloid precursor protein." Exp Gerontol **35**(4): 453-60.
- Xia, W., W. J. Ray, B. L. Ostaszewski, et al. (2000). "Presenilin complexes with the C-terminal fragments of amyloid precursor protein at the sites of amyloid beta-protein generation." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(16): 9299-304.
- Xu, W. L., C. X. Qiu, A. Wahlin, et al. (2004). "Diabetes mellitus and risk of dementia in the Kungsholmen project: a 6-year follow-up study." Neurology **63**(7): 1181-6.

<b>Y</b>
----------

- Yamagata, T., T. Momoi, H. Kumagai, et al. (1993). "Distribution of retinoic acid receptor beta proteins in rat brain: up-regulation by retinoic acid." Biomedical Research **14**(3): 183-90.
- Yamamoto, Y., R. Zolfaghari and A. C. Ross (2000). "Regulation of CYP26 (cytochrome P450RAI) mRNA expression and retinoic acid metabolism by retinoids and dietary vitamin A in liver of mice and rats." Faseb J **14**(13): 2119-27.
- Yan, Y. and C. Wang (2007). "Abeta40 protects non-toxic Abeta42 monomer from aggregation." J Mol Biol **369**(4): 909-16.
- Yang, Z. N., G. J. Davis, T. D. Hurley, et al. (1994). "Catalytic efficiency of human alcohol dehydrogenases for retinol oxidation and retinal reduction." Alcohol Clin Exp Res **18**(3): 587-91.
- Yoshimasu, F., E. Kokmen, I. D. Hay, et al. (1991). "The association between Alzheimer's disease and thyroid disease in Rochester, Minnesota." Neurology **41**(11): 1745-7.
- Yu, Y., J. He, Y. Zhang, et al. (2009). "Increased hippocampal neurogenesis in the progressive stage of Alzheimer's disease phenotype in an APP/PS1 double transgenic mouse model." Hippocampus.

## Z

- Zaidi, S. M. and N. Banu (2004). "Antioxidant potential of vitamins A, E and C in modulating oxidative stress in rat brain." *Clin Chim Acta* **340**(1-2): 229-33.
- Zaman, Z., S. Roche, P. Fielden, et al. (1992). "Plasma concentrations of vitamins A and E and carotenoids in Alzheimer's disease." *Age Ageing* **21**(2): 91-4.
- Zetterstrom, R. H., E. Lindqvist, A. Mata de Urquiza, et al. (1999). "Role of retinoids in the CNS: differential expression of retinoid binding proteins and receptors and evidence for presence of retinoic acid." *Eur J Neurosci* **11**(2): 407-16.
- Zetterstrom, R. H., A. Simon, M. M. Giacobini, et al. (1994). "Localization of cellular retinoid-binding proteins suggests specific roles for retinoids in the adult central nervous system." *Neuroscience* **62**(3): 899-918.
- Zhang, Q., E. T. Powers, J. Nieva, et al. (2004). "Metabolite-initiated protein misfolding may trigger Alzheimer's disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(14): 4752-7.
- Zhang, Q. Y., D. Dunbar and L. Kaminsky (2000). "Human cytochrome P-450 metabolism of retinals to retinoic acids." *Drug Metab Dispos* **28**(3): 292-7.
- Zhang, X. H., H. Zhang, Y. Tu, et al. (2005). "Identification of a novel protein for memory regulation in the hippocampus." *Biochem Biophys Res Commun* **334**(2): 418-24.
- Zhao, D., P. McCaffery, K. J. Ivins, et al. (1996). "Molecular identification of a major retinoic-acid-synthesizing enzyme, a retinaldehyde-specific dehydrogenase." *Eur J Biochem* **240**(1): 15-22.
- Zhao, L., B. Teter, T. Morihara, et al. (2004). "Insulin-degrading enzyme as a downstream target of insulin receptor signaling cascade: implications for Alzheimer's disease intervention." *J Neurosci* **24**(49): 11120-6.
- Zhao, M., S. Momma, K. Delfani, et al. (2003). "Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(13): 7925-30.
- Zheng, H., M. Jiang, M. E. Trumbauer, et al. (1995). "beta-Amyloid precursor protein-deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity." *Cell* **81**(4): 525-31.
- Zheng, H. and E. H. Koo (2006). "The amyloid precursor protein: beyond amyloid." *Mol Neurodegener* **1**: 5.
- Zheng, W. H., S. Bastianetto, F. Mennicken, et al. (2002). "Amyloid beta peptide induces tau phosphorylation and loss of cholinergic neurons in rat primary septal cultures." *Neuroscience* **115**(1): 201-11.
- Zhu, X., A. K. Raina, H. G. Lee, et al. (2004). "Oxidative stress signalling in Alzheimer's disease." *Brain Res* **1000**(1-2): 32-9.
- Zhu, Z., X. Li, W. Chen, et al. (2004). "Prenatal stress causes gender-dependent neuronal loss and oxidative stress in rat hippocampus." *J Neurosci Res* **78**(6): 837-44.
- Ziabreva, I., E. Perry, R. Perry, et al. (2006). "Altered neurogenesis in Alzheimer's disease." *J Psychosom Res* **61**(3): 311-6.
- Zitnik, G. and G. M. Martin (2002). "Age-related decline in neurogenesis: old cells or old environment?" *J Neurosci Res* **70**(3): 258-63.
- Zohar, O., S. Cavallaro, V. D'Agata, et al. (2003). "Quantification and distribution of beta-secretase alternative splice variants in the rat and human brain." *Brain Res Mol Brain Res* **115**(1): 63-8.
- Zohar, O., C. G. Pick, S. Cavallaro, et al. (2005). "Age-dependent differential expression of BACE splice variants in brain regions of tg2576 mice." *Neurobiol Aging* **26**(8): 1167-75.

