

N° d'ordre: 2826

# THESE

PRESENTEE A

**L'UNIVERSITE BORDEAUX I**  
ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DU VIVANT, GEOSCIENCES,  
SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT

PAR

**Catherine BOUCHERON**

POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR**

SPECIALITE : SCIENCES DES ALIMENTS ET NUTRITION

---

**ETUDE DES EFFETS DE LA CONSOMMATION D'ALCOOL SUR L'ACTION CELLULAIRE  
DE L'ACIDE RETINOÏQUE ET DE LA TRIIODOTHYRONINE EN FONCTION DE L'AGE :  
APPROCHES EXPERIMENTALE ET BIOMEDICALE**

Soutenue le 18 juin 2004

*Après avis de MM:*

P. DE WITTE (PR. Université catholique de Louvain)

Rapporteur

C. MAGNAN (MdC. Université Paris VII)

Rapporteur

*Devant la commission d'examen formée de:*

R. JAFFARD (PR. Université Bordeaux 1)

Président-Rapporteur

P. DE WITTE (PR. Université catholique de Louvain)

Examineurs

C. MAGNAN (MdC. Université Paris VII)

A. IRON (MCU-PH Université Bordeaux 2)

G. de SAINT BLANQUAT (président du comité scientifique de l'IREB, Paris)

P. HIGUERET (PR. Université Bordeaux 1)

S. ALFOS (Ingénieur d'Etude Université Bordeaux 1)

Invité



## ***REMERCIEMENTS***

Les travaux qui ont fait l'objet de ce mémoire ont été réalisés au sein de l'Unité de Nutrition et Signalisation Cellulaire de l'Université Bordeaux1, dirigée par le Professeur Paul Higuere.

Je remercie mon Directeur de thèse, **M. Paul HIGUERET**, de m'avoir permis d'intégrer son équipe de recherche, de m'avoir confié ce sujet de recherche fort intéressant et de m'avoir accordé sa confiance pendant ces 4 années.

J'adresse mes remerciements à **M. Philippe DE WITTE**, Professeur à l'Université Catholique de Louvain, d'avoir accepté de juger ce mémoire de thèse malgré un emploi du temps très chargé. L'avis et les remarques pertinentes d'un spécialiste de l'alcool contribuent précieusement à la valeur de ce travail.

De la même manière, je tiens à remercier **M. Christophe MAGNAN**, Maître de Conférence à l'Université Paris VII, pour s'être prêté au rôle de rapporteur. Son analyse a été d'un grand intérêt dans l'examen de ce travail.

J'exprime ma reconnaissance à **M le Professeur Robert JAFFARD** pour avoir présidé la commission d'examen de cette thèse. Dans le cadre d'une collaboration entre le laboratoire de Neurosciences Cognitives et celui de Nutrition et Signalisation Cellulaire, ses compétences, non seulement dans le domaine de la nutrition mais surtout dans celui des Neurosciences, ont fortement contribué à la réalisation de ce travail et permettent une ouverture transdisciplinaire de cette recherche.

Je remercie **M. Georges de SAINT BLANQUAT**, Président du comité scientifique de l'IREB, d'avoir accepté de juger ce travail. Ses nombreux conseils, ses encouragements concernant les thèmes de recherche abordés, ainsi que sa sympathie ont été fort appréciés.

De la même manière, j'exprime mes remerciements à **M. Albert IRON**, Maître de Conférence au laboratoire de Biochimie Médicale et Biologie Moléculaire CHU Pellegrin de Bordeaux,

pour avoir accepté d'examiner mes travaux, et pour l'enthousiasme dont il a fait part concernant ce travail.

Une partie de cette étude a été réalisée au sein du laboratoire de Biochimie du CHU Pellegrin de Bordeaux. A ce titre, je tiens à remercier **Mme Denise HIGUERET**, Maître de Conférence, pour son accueil, sa grande disponibilité et ses conseils.

J'exprime toute ma reconnaissance à **M. Serge ALFOS**, Ingénieur d'études, qui m'a encadrée durant ces 4 années de thèse. Je le remercie sincèrement pour ses conseils scientifiques et sa grande disponibilité. Son expérience, sa gentillesse et son soutien ont été précieux. Je le remercie encore d'avoir contribué au bon déroulement de cette thèse.

Au sein de l'équipe « cerveau », je remercie également **Mme Véronique Pallet** et **Melle Valérie Enderlin** pour leur disponibilité, l'ensemble de leurs conseils et leurs compétences scientifiques.

Au sein du laboratoire, je remercie également : **Mme Catherine Suberville** et **Mme Pierette Cassand** pour leur sympathie et leur bonne humeur ; **M. Laurent Caune** pour son aide aux soins apportés aux animaux ; **Mme Liliane Régner** pour sa gentillesse et **Mme Isabelle Gay** pour sa disponibilité et sa bonne humeur.

J'adresse également mes remerciements à tous les étudiants et plus particulièrement à **Marianne Husson** qui m'a initiée à un certain nombre de techniques utilisées au laboratoire. Je la remercie à la fois pour nos discussions scientifiques mais aussi pour sa bonne humeur et son soutien. Je lui souhaite bon courage et beaucoup de réussite pour la suite. Je remercie également **Catherine Féart** qui a débuté sa thèse en même temps que moi et avec qui j'ai partagé l'expérience « lymphocytes » à l'hôpital Pellegrin. Je remercie la dernière venue dans le bureau « cerveau » **Julie Vallortigara** pour sa bonne humeur inconditionnelle et communicative. Je remercie également tous les autres : **Anabelle Redonnet**, **Khalid Jamali**, **Barbara Delage**, **Céline Bairras**, **Frédérique Mingaud**, **Aurélien Bric**, **Ludovic Menard** et **Benjamin Buaud**.

Pour finir, je remercie très sincèrement **ma famille, mes parents, mes grands-parents, ma sœur, Christophe et Adrien** (sans oublier Chipie, Junior et E.T. !!!) pour leur soutien sans faille notamment dans les périodes difficiles.

Je leurs dédie ce travail.



# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
<b>CHAPITRE I : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>5</b>
<b>A. LE CERVEAU : ORGANE CIBLE DE LA VITAMINE A ET DES HORMONES THYROÏDIENNES</b>	<b>5</b>
<b>I- Données générales sur la vitamine A</b>	<b>5</b>
I.1. Définitions	5
I.2. Source et stockage	5
I.3. Transport vers les tissus cibles	9
I.4. Métabolisme	10
<i>I.4.1. Principales voies métaboliques</i>	10
<i>I.4.2. Métabolisme cérébral</i>	11
<b>II. Données générales sur les hormones thyroïdiennes</b>	<b>15</b>
II.1. Définitions	15
II.2. Biosynthèse	16
II.3. Transport	18
<b>II. Mode d'action cellulaire de la vitamine A et des hormones thyroïdiennes</b>	<b>19</b>
II.1. La superfamille des récepteurs nucléaires	19
<i>II.1.1 Données générales</i>	19
<i>II.1.2 Structure générale des récepteurs nucléaires</i>	21
<i>II.1.3. Mode d'action nucléaire</i>	22
<b>II.1.3.1. Les éléments de réponse</b>	<b>22</b>
<i>II.1.3 Mode d'action</i>	23
<b>II.1.3.2 Rôle des cofacteurs de transcription</b>	<b>24</b>
<i>II.1.4 Interaction des récepteurs nucléaires</i>	24
II.2 Les récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque	25
<i>II.2.2 Les différents récepteurs</i>	25
<i>II.2.3 Distribution tissulaire</i>	25
II.3. Les récepteurs nucléaires de la triiodothyronine	28
<i>II.3.1 Les différents récepteurs</i>	28
<i>II.3.2. Distribution tissulaire</i>	28
II.4. Régulation de l'expression des récepteurs et interactions entre les voies d'action des rétinoïdes et des hormones thyroïdiennes	29

II.4.1. Autorégulation des récepteurs	29
II.4.2. Hétérorégulation des récepteurs et interactions des voies d'action des rétinoïdes et des hormones thyroïdiennes	30
<b>III- Rétinoïdes, hormones thyroïdiennes et physiologie du cerveau adulte</b>	<b>31</b>
III.1. Implication des rétinoïdes dans le fonctionnement du cerveau adulte	31
III.2. Implication des hormones thyroïdiennes dans le fonctionnement du cerveau adulte	34
III.3. Gènes cibles des rétinoïdes et des hormones thyroïdiennes, impliqués dans la plasticité synaptique et étudiés dans ce travail de thèse	36
III.3.1. Quelques données sur la plasticité synaptique et la potentialisation à long terme (PLT)	36
III.3.2. Gènes cibles des rétinoïdes et des hormones thyroïdiennes, étudiés dans ce travail de thèse	36
III.3.2.1. La transglutaminase tissulaire (tTG)	37
III.3.2.2. La neuromoduline (GAP-43)	37
III.3.2.3. La neurogranine (RC3)	38
<b>B. RETINOÏDES ET HORMONES THYROÏDIENNES AU COURS DU VIEILLISSEMENT CEREBRAL</b>	<b>40</b>
<b>I. Quelques généralités sur le vieillissement</b>	<b>40</b>
<b>II. Le vieillissement cérébral</b>	<b>41</b>
<b>III. Les statuts vitaminique A et thyroïdien au cours du vieillissement cérébral</b>	<b>41</b>
III.1. Vieillissement et biodisponibilité de la vitamine A	41
III.2. Vieillissement et statut thyroïdien	42
<b>IV. Actions cellulaires des rétinoïdes et des hormones thyroïdiennes au cours du vieillissement</b>	<b>43</b>
<b>C. RETINOÏDES, HORMONES THYROÏDIENNES ET ALCOOL</b>	<b>45</b>
<b>I. Alcool : absorption, distribution tissulaire et métabolisme</b>	<b>45</b>
<b>II. Alcool et cerveau</b>	<b>46</b>
<b>III. Alcool et statuts vitaminique A et thyroïdien</b>	<b>47</b>
III.1. Alcool et statut vitaminique A	47
III.2. Alcool et statut thyroïdien	50
<b>IV. Alcool et action nucléaire des rétinoïdes et des hormones thyroïdiennes</b>	<b>51</b>
<b>OBJECTIFS DE LA THESE</b>	<b>55</b>



<b>CHAPITRE II :</b>	
<b>Effets d'une consommation chronique d'alcool sur l'action cellulaire de l'acide rétinoïque et la mémoire de travail chez la souris adulte</b>	<b>59</b>
<b>Méthodologie utilisée</b>	<b>60</b>
<b>Principaux résultats</b>	<b>61</b>
PUBLICATION 1	
A RETINOIC ACID RECEPTOR ANTAGONIST SUPPRESSES BRAIN RETINOIC ACID RECEPTOR OVEREXPRESSION AND REVERSES A WORKING MEMORY DEFICIT INDUCED BY CHRONIC ETHANOL CONSUMPTION IN MICE	<b>63</b>
<b>Conclusion</b>	<b>65</b>
<b>CHAPITRE III :</b>	
<b>Etude des effets d'une consommation chronique d'alcool sur l'action cellulaire de l'acide rétinoïque et de la triiodothyronine au cours du vieillissement cérébral</b>	<b>67</b>
<b>Méthodologie utilisée</b>	<b>68</b>
<b>Principaux résultats</b>	<b>68</b>
PUBLICATION 2	
ETHANOL CONSUMPTION REVERSES THE AGE-RELATED HYPO-EXPRESSION OF TRIIODOTHYRONINE AND RETINOIC ACID NUCLEAR RECEPTORS AND ASSOCIATED TARGET GENES CODING FOR NEUROGRANIN AND NEUROMODULIN, IN MOUSE BRAIN	<b>71</b>
<b>Conclusion</b>	<b>73</b>
<b>CHAPITRE IV :</b>	
<b>Etude des effets d'une consommation modérée d'alcool sur l'action cellulaire de l'acide rétinoïque et de la triiodothyronine au cours du vieillissement cérébral</b>	<b>75</b>
<b>Méthodologie utilisée</b>	<b>76</b>
<b>Principaux résultats</b>	<b>77</b>
PUBLICATION 3	
MODERATE ETHANOL CONSUMPTION SUPPRESSES AN AGE-RELATED RELATIONAL DEFICIT IN MICE: INVOLVEMENT OF RETINOID AND TRIIODOTHYRONINE SIGNALLING PATHWAYS	<b>79</b>
<b>Conclusion</b>	<b>81</b>

**CHAPITRE V :**  
**Consommation d'alcool et expression des récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque et de la triiodothyronine dans les cellules mononucléées du sang de sujets âgés**

83

**Contexte de l'étude** 84

**Protocole expérimental** 85

**Principaux résultats** 86

**PUBLICATION 4**

**RELATIONSHIP BETWEEN LONG-TERM ALCOHOL CONSUMPTION AND RETINOIC ACID AND TRIIODOTHYRONINE NUCLEAR RECEPTOR EXPRESSION IN MONONUCLEAR CELLS OF HEALTHY SUBJECTS** 89

**Conclusion** 91

**CHAPITRE VI : DISCUSSION GENERALE**

**Partie expérimentale** 93

A. RAPPELS DES PRINCIPAUX RESULTATS 93

B. DISCUSSION GENERALE 95

**I- Implication potentielle de la suractivation des voies de signalisation de l'AR et de la T3 dans certains troubles neurobiologiques liés à une consommation chronique d'alcool, chez l'animal adulte**

95

**II- La consommation chronique d'alcool maintient l'activité cellulaire des voies d'action de l'AR et de la T3 et atténue les troubles neurobiologiques, liés à l'âge**

100

**III- Les effets de l'alcool sur les voies de signalisation de l'AR et de la T3 dépendent non seulement de la quantité d'éthanol ingérée, mais aussi de l'âge des animaux**

101

**Partie biomédicale** 103

A. RAPPELS DES PRINCIPAUX RESULTATS 103

B. DISCUSSION GENERALE 105

**I- Dans la population étudiée, la consommation d'alcool ne modifie pas les statuts vitaminique A et thyroïdien de sujets âgés**

105

**II- L'expression des récepteurs RAR $\alpha$  et TR $\alpha$ , dans les PBMC de sujets âgés est corrélée à la quantité d'alcool consommé**

106

<b>Conclusion et Perspectives</b>	<b>109</b>
<b>References Bibliographiques</b>	<b>111</b>



## ABREVIATIONS

ADH	alcool déshydrogénase
ADN	acide désoxyribonucléique
ALDH	aldéhyde déshydrogénase
AMPA	$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxalolepropiobate
AR	acide rétinoïque
ARAT	«acyl-CoA : retinol acyl transferase»
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messenger
BDNF	«brain-derived neurotrophic factor»
CaM	calmoduline
CaMKII	calmoduline kinase $Ca^{2+}$ /calmoduline dépendante de type II
CaN	calcineurine
CD 2665	molécule antagoniste du récepteur $RAR\beta$
CRABP	«cellular retinoic acid binding protein» : protéine cellulaire liant l'acide rétinoïque
CRBP	«cellular retinol binding protein» : protéine cellulaire liant le rétinol
DR	«direct repeat» : motif en répétition directe
ER	récepteur nucléaire des estrogènes
GABA	« $\gamma$ -aminobutyric acid»
GAP-43	«growth associated protein» : neuromoduline
GR	récepteur nucléaire des glucocorticoïdes
HRE	«hormone response element»
LCR	liquide céphalo-rachidien
LRAT	lécithine rétinol acyl transférase

MDR	«medium chain dehydrogenase/reductase»
MEOS	système microsomal d'oxydation du rétinol
NAD	nicotinamide adénine dinucléotide
NADP	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NGF	«nerve growth factor»
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
NT-3	«neurotrophin-3»
PBMC	«peripheral blood mononuclear cell» : cellules mononucléées du sang périphérique
PCR	«polymerase chain reaction» : amplification enzymatique en chaîne
PKC	protéine kinase C
PLT	potentialisation à long terme
PTU	propyle thiouracile
RALDH	rétinaldéhyde déshydrogénase
RAR	récepteur nucléaire de l'acide tout- <i>trans</i> rétinoïque
RARE	élément de réponse à l'acide rétinoïque
RBP	«retinol binding protein» : protéine liant le rétinol
RC3	neurogranine
RDH/RoDH	rétinol déshydrogénases microsomales
REH	rétinyl ester hydrolase
RT-PCR	«reverse transcription and polymerase chain reaction»
RXR	récepteur nucléaire de l'acide 9- <i>cis</i> rétinoïque
RXRE	élément de réponse à l'acide 9- <i>cis</i> rétinoïque
SDR	«short chain dehydrogenase/reductase»
SNC	système nerveux central
rT2	reverse diiodothyronine
rT3	reverse triiodothyronine
T3	3,5,3'-triiodothyronine

T4	3,5,3',5'-tétraiodothyronine ou thyroxine
TBG	«thyroxin binding protein»
TR	récepteur nucléaire de la triiodothyronine
TRE	élément de réponse aux hormones thyroïdiennes
TRH	thyrolibérine
TSH	thyrotropine
tTG	transglutaminase tissulaire
TTR	transthyrétine





# **LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX**

## Liste des figures

<b>Figure 1</b>	Formules chimiques de quelques rétinoïdes	<b>6</b>
<b>Figure 2</b>	Stockage, transport et mode d'action de la vitamine A	<b>8</b>
<b>Figure 3</b>	Métabolisme de la vitamine A	<b>12</b>
<b>Figure 4</b>	Principales étapes de la désiodation de la thyroxine	<b>15</b>
<b>Figure 5</b>	Métabolisme, transport et mode d'action des hormones thyroïdiennes	<b>17</b>
<b>Figure 6</b>	Architecture des récepteurs nucléaires	<b>23</b>
<b>Figure 7</b>	Modèle d'activation en deux étapes des récepteurs nucléaires	<b>26</b>
<b>Figure 8</b>	Métabolisme hépatique de l'éthanol, dans différentes conditions d'alcoolisation	<b>48</b>
<b>Figure 9</b>	Corrélations entre le niveau d'expression des ARNm des récepteurs nucléaires RAR $\alpha$ (A) et TR $\alpha$ (B) dans les PBMC et la consommation d'alcool, chez des sujets âgés	<b>88</b>
<b>Figure 10</b>	Schéma illustrant la «normalisation» de l'expression des ARNm des récepteurs TR $\alpha$ , dans les PBMC de sujets âgés consommateurs d'alcool	<b>92</b>
<b>Figure 11</b>	Interférences entre les voies de métabolisation de la vitamine A et de l'éthanol	<b>96</b>
<b>Figure 12</b>	Schéma récapitulatif des différents niveaux d'intervention de rétinoïdes et des hormones thyroïdiennes au niveau d'une synapse	<b>98</b>
<b>Figure 13</b>	Schéma synthétique illustrant les conséquences de la consommation d'alcool sur l'activité des voies de signalisation de l'AR et de la T3 et les capacités mnésiques en fonction de l'âge	<b>101</b>

## Liste des tableaux

<b>Tableau I</b>	Quelques membres de la superfamille des récepteurs nucléaires des hormones	<b>20</b>
<b>Tableau II</b>	Exemples de gènes régulés par l'acide rétinoïque dans le cerveau	<b>33</b>
<b>Tableau III</b>	Exemples de gènes régulés par la triiodothyronine dans le cerveau	<b>35</b>
<b>Tableau IV</b>	Paramètres sériques caractérisant les statuts vitaminique A et thyroïdien de la population étudiée	<b>86</b>

## **INTRODUCTION**



## **INTRODUCTION**

La vitamine A et les hormones thyroïdiennes ont un large spectre d'actions dans de nombreux processus biologiques tels que le développement, la différenciation, l'homéostasie, le métabolisme (Sporn et coll., 1994 ; Yen, 2001). Nos connaissances sur le mode d'action cellulaire de ces molécules ont été fondamentalement marquées par la découverte des récepteurs nucléaires de leurs métabolites actifs (respectivement l'acide rétinoïque et la triiodothyronine) (Petkovitch et coll., 1987 ; Bernal et coll., 2003). En effet, on sait aujourd'hui que ces récepteurs nucléaires interviennent en tant que facteurs de transcription, inductibles par leurs ligands, dans le contrôle de l'expression génique (revues dans Bastien et Rochette-Egly, 2004 ; et Bassett et coll., 2003). Ils appartiennent à une « superfamille » de récepteurs nucléaires, incluant également les récepteurs des hormones stéroïdes, de la vitamine D, des proliférateurs de péroxysomes... Les récepteurs de cette superfamille se lient sous formes de dimères sur le promoteur de leurs gènes cibles, par reconnaissance spécifique d'éléments de réponse caractéristiques du dimère impliqué. La réponse transcriptionnelle (stimulation ou inhibition de la transcription) est dépendante des éléments de réponse mis en jeu, des complexes de transcription en présence, de la biodisponibilité en ligands. Il apparaît ainsi qu'un changement du taux des récepteurs peut générer un changement dans la nature des dimères formés et, secondairement, dans la nature et/ou l'amplitude des réponses des gènes cibles.

Aujourd'hui, l'intervention de l'acide rétinoïque et des hormones thyroïdiennes dans le développement du système nerveux central est bien documenté (revues dans Maden et Hind, 2003 ; et Smith et coll., 2002). En revanche, leurs rôles dans le cerveau adulte sont encore moins bien connus. Néanmoins, il apparaît que le cerveau adulte possède toute la machinerie biochimique nécessaire à la synthèse de l'acide rétinoïque et de la

triiodothyronine. Par ailleurs, certains gènes impliqués dans la plasticité synaptique<sup>1</sup>, sont soumis à un réseau de signaux régulateurs parmi lesquels les rétinoïdes et les hormones thyroïdiennes semblent occuper une place essentielle.

L'implication de ces molécules dans la plasticité synaptique et les fonctions cognitives a été mise en évidence dans des modèles expérimentaux présentant des altérations dans la voie de signalisation de l'acide rétinoïque (Chiang et coll., 1998 ; Misner et coll., 2001 ; Cocco et coll., 2002), et des hormones thyroïdiennes (revue dans Smith et coll., 2002). Une étude réalisée en collaboration avec le laboratoire de Neurosciences Cognitives (UMR 5106 CNRS Université Bordeaux1), chez la souris âgée, a mis en évidence que le vieillissement cérébral s'accompagne d'une hypoexpression de la voie d'action des rétinoïdes (diminution de l'expression des récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque) et d'un gène cible impliqué dans la plasticité synaptique (neurogranine), ainsi que des déficits de mémoire. L'administration d'acide rétinoïque aux animaux âgés a permis de ramener l'activité de sa voie de signalisation à un niveau comparable à celui des animaux adultes et de supprimer totalement et sélectivement les déficits de mémoire observés (Etchamendy et coll., 2001). Le vieillissement cérébral s'accompagne également d'une hypoexpression des récepteurs nucléaires des hormones thyroïdiennes (Enderlin et coll., 1997a). C'est pourquoi, compte tenu des données rappelées ci-dessus, nous privilégions actuellement une hypothèse de travail qui suggère l'intervention des rétinoïdes et des hormones thyroïdiennes dans les altérations de la plasticité synaptique et la genèse des troubles mnésiques du sujet âgé.

Le vieillissement de la population va constituer dans les prochaines décennies un problème socio-économique majeur dans les pays occidentaux. Le cerveau est l'un des organes les plus touchés par la sénescence et l'incidence de la démence est de nos jours d'environ 5% de la population âgée de plus de 65 ans, et de plus de 50% pour les plus de 85 ans (Dugué et coll., 2003). C'est pourquoi l'identification des altérations neurobiologiques responsables des troubles mnésiques du sujet âgé constitue un objectif majeur des recherches sur le vieillissement.

---

<sup>1</sup> Plasticité synaptique : capacité que possède une région cérébrale à réorganiser son réseau synaptique pour compenser une lésion tissulaire ou pour répondre à de nouvelles conditions de l'environnement.

Par ailleurs, alors que les effets négatifs d'une consommation excessive d'alcool sur la santé ne font plus l'objet de controverses, des données épidémiologiques récentes plaident en faveur d'effets positifs potentiels d'une **consommation modérée d'alcool** sur les risques de maladies cardiovasculaires mais également sur l'apparition de troubles mnésiques, chez des sujets âgés (Expertise collective-INSERM, 2001).

Les interférences de l'éthanol dans les métabolismes du rétinol (revue dans Leo et Lieber, 1999) et des hormones thyroïdiennes (Baumgartner et coll., 1997) sont aujourd'hui bien documentées. A titre d'exemple, une consommation chronique d'alcool conduit à des modifications des statuts vitaminique A et thyroïdien (Leo et Lieber, 1999 ; Hermann et coll., 2002). D'autres résultats obtenus au laboratoire ont mis en évidence une augmentation de l'expression des récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque et de la triiodothyronine dans le foie et le cerveau de souris C57Bl/6 soumises à une consommation chronique d'alcool (Pallet et coll., 1993 ; Alfos et coll., 1996). Par ailleurs, dans ces mêmes conditions d'alcoolisation chronique des souris adultes BALB/c présentent des troubles de la mémoire spatiale et plus particulièrement des déficits sur un test d'alternance spontanée (Béracochéa et coll., 1987).

Les données bibliographiques présentées ci-dessus soulignent (i) l'intervention de l'alcool dans le métabolisme de la vitamine A et celui des hormones thyroïdiennes, (ii) les rôles fondamentaux que jouent leurs métabolites actifs (AR et T3) dans les processus neurobiologiques et cognitifs.

Les taux d'AR et de T3 sont étroitement régulés dans les cellules cibles et les interférences de l'alcool dans leurs métabolismes peuvent générer un risque de s'écarter d'un niveau optimum d'activité des voies de signalisation, requis pour le fonctionnement normal de certains processus neurobiologiques et cognitifs.

Dans ce contexte, notre travail de thèse visait d'abord à répondre à plusieurs questions essentielles.

1. Quelles sont les répercussions d'une consommation chronique d'alcool sur l'activité des voies de signalisation de l'AR et de la T3 et sur certains processus neurobiologiques chez l'animal adulte ?

2. Une consommation modérée d'alcool, chez un animal âgé, serait-elle susceptible d'activer les voies de signalisation de la vitamine A et des hormones thyroïdiennes, et par voie de conséquence, d'améliorer certains déficits mnésiques associés au vieillissement ?

Par la suite et conformément aux orientations générales du laboratoire, nous avons voulu éprouver nos hypothèses chez l'Homme. Ainsi, dans un premier temps nous avons cherché à répondre à la question suivante :

3. La consommation chronique d'alcool induit-elle une modification de l'activité des voies de signalisation de l'AR et de la T3 chez des sujets âgés ?

Les résultats de ce travail font l'objet de quatre publications (une acceptée, deux soumises, une en préparation) qui sont présentées dans les chapitres II, III, IV et V du mémoire. Une première étude, dont les résultats sont présentés dans le chapitre II, a permis de préciser la part prise par la surexpression des récepteurs de l'acide rétinoïque dans la genèse de certains troubles neurobiologiques et mnésiques observés chez des animaux alcoolisés. Les deux chapitres suivants rapportent les effets combinés du vieillissement et de deux types de consommations modérées d'alcool, éthanol 12 % (chapitre III) ou éthanol 6% (chapitre IV), sur l'activité des voies d'action des rétinoïdes et des hormones thyroïdiennes et les performances cognitives. Le chapitre V est consacré à l'étude biomédicale, mise en place pour éprouver nos hypothèses construites à partir de données obtenues chez l'animal. Enfin, le chapitre VI de ce mémoire est consacré à la discussion générale.



**CHAPITRE I**  
**DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES**



## **DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES**

### **A. LE CERVEAU : ORGANE CIBLE DE LA VITAMINE A ET DES HORMONES THYROÏDIENNES**

#### **I- Données générales sur la vitamine A**

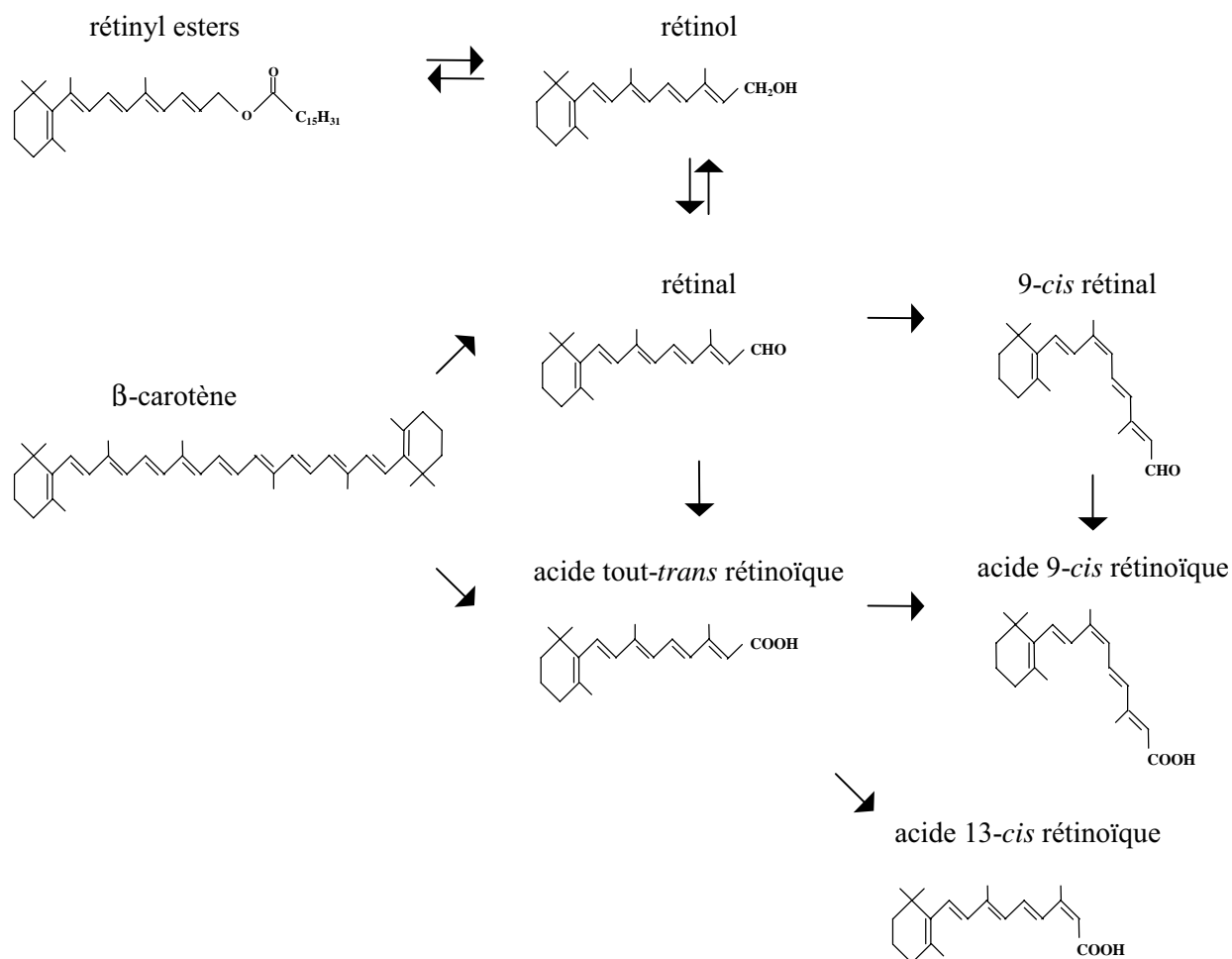
##### **I.1. Définitions**

La vitamine A, ou rétinol, compte de nombreux dérivés métaboliques, composés naturels ou analogues synthétiques, rassemblés sous le terme de « rétinoïdes », parmi lesquels certains sont illustrés dans la **figure 1**. Cette vitamine a été isolée pour la première fois dans la rétine, d'où le nom de « rétinol ».

Les structures isopréniques des rétinoïdes leur confèrent un caractère lipophile. Ces molécules hydrophobes ont nécessité le développement d'un système biologique adéquat comprenant des protéines de liaison des rétinoïdes qui permettent le transport, le stockage et le métabolisme de la vitamine A en molécules biologiquement actives. La structure particulière de chaque rétinoïde, liée à la fonction (alcool, aldéhyde ou acide) portée par la chaîne latérale et à la configuration des doubles liaisons (*cis* ou *trans*) qu'elle comporte, induit une certaine spécificité d'activité.

##### **I.2. Source et stockage**

La vitamine A est un nutriment présent exclusivement dans les produits d'origine animale, apporté sous forme de rétinol ou sous formes estérifiées du rétinol (c'est-à-dire les rétinyl esters). Les sources les plus importantes sont l'huile de foie de poisson, le beurre, le lait, le fromage et les œufs. L'organisme peut également « s'approvisionner » indirectement



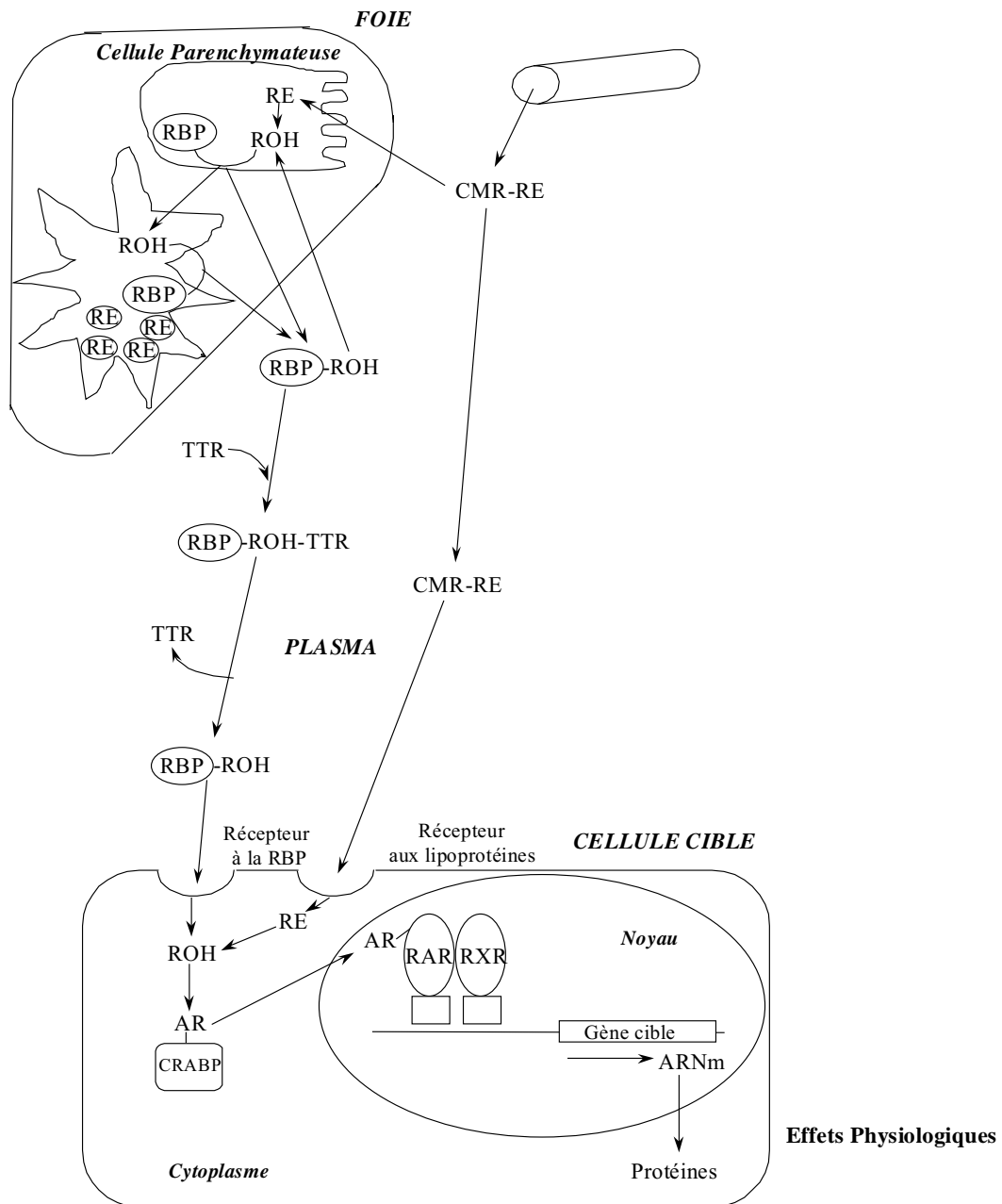
**Figure 1 : Formules chimiques de quelques rétinoïdes.**

Les principales formes de la vitamine A ont été représentées. Lorsque cela n'est pas précisé, il s'agit d'une configuration tout-*trans*.

en vitamine A par ingestion de provitamines A (essentiellement du  $\beta$ -carotène), rencontrées en quantité importante dans certains légumes (carottes, épinards, choux) et fruits (orange, abricots). Ces caroténoïdes d'origine végétale sont ensuite convertis au niveau de l'intestin en vitamine A.

Le rétinol est la forme circulante la plus abondante dans le sang, tandis que les rétinyl esters, en particulier le palmitate, représentent la forme principale de stockage principalement dans le foie (90% des réserves s'effectuent dans les cellules de Ito). En fonction des besoins de l'organisme, la vitamine A sera soit stockée, soit directement utilisée par les cellules cibles (**figure 2**).

Les formes estérifiées sont hydrolysées dans la lumière intestinale par une REH (rétinyl ester hydrolase) (Boileau et coll., 2000), puis le rétinol est absorbé par les entérocytes (Dew et Ong, 1994). La LRAT (lecithine:rétinol acyl transférase) joue un rôle prépondérant dans l'estérification du rétinol lorsque celui-ci est lié à une protéine cytoplasmique spécifique, la CRBP ("cellular retinol binding protein") (Quick et Ong, 1990 ; Ruiz et coll., 1999 ; Zolfaghari et Ross, 2000). Lorsque de grandes quantités de rétinol sont ingérées, les capacités de liaison de la CRBP sont dépassées et une autre enzyme, l'ARAT (acyl-CoA:rétinol acyl transférase), participe alors aux processus d'estérification. Les rétinyl esters ainsi formés sont ensuite incorporés dans les chylomicrons puis excrétés dans la circulation sanguine *via* la voie lymphatique. Au cours de leur circulation, quelques-uns des chylomicrons peuvent être captés directement par les tissus qui possèdent des récepteurs spécifiques à la surface de leurs cellules, permettant ainsi une action rapide des rétinoïdes (Skrede et coll., 1992), mais la plupart atteignent le foie (Mahley et Hussain, 1991 ; Cooper, 1997), qui constitue le principal organe de stockage et de métabolisation de la vitamine A. Dans cet organe, deux types de cellules vont permettre la métabolisation de la vitamine A. Les cellules parenchymateuses sont responsables de la captation hépatique des chylomicrons (Blaner et coll., 1985) et de la synthèse d'une protéine de transport spécifique du rétinol, la RBP ("retinol binding protein") (Blomhoff et coll., 1991). Le rétinyl ester y est hydrolysé en rétinol qui est ensuite transféré vers les lipocytes (également appelés cellules de Ito ou cellules étoilées "Stellate cells"), par un mécanisme non encore élucidé mais dans lequel participent certainement les CRBP. Le rétinol est alors stocké, majoritairement sous forme de palmitate de rétinol (Nanni et coll., 1997). L'estérification du rétinol est catalysée, comme dans les entérocytes, soit par l'ARAT,



**Figure 2 : Stockage, transport et mode d'action de la vitamine A**

AR : acide rétinoïque ; CM : chylomicrons ; CMR : chylomicrons remnants ; CRABP : "cellular retinoic acid binding protein" ; CRBP : "cellular retinol binding protein" ; RAR : récepteur de l'acide rétinoïque tout-*trans* ; RARE : élément de réponse à l'acide rétinoïque ; RBP : "retinol binding protein" ; RE : rétinyl esters ; ROH : rétinol ; RXR : récepteur de l'acide 9-*cis* rétinoïque ; TTR : transthyréline.

(D'après Blomhoff, 1994)

soit par la LRAT quand le rétinol est lié à la CRBPI (revue dans Noy, 2000). Les protéines de liaison intracellulaires jouent un rôle important dans la régulation du métabolisme du rétinol et protègent les cellules du risque lié à la présence excessive de rétinol libre dans leurs membranes (revue dans Noy, 2000).

### **I.3. Transport vers les tissus cibles**

Le foie relargue, en fonction des besoins de l'organisme, la vitamine A dans la circulation sanguine, majoritairement sous forme rétinol liée à la RBP (Soprano et Blaner, 1994 ; Quadro et coll., 2003). Dans le plasma, l'holo-RBP (RBP ayant fixé son ligand) circule jusqu'aux tissus cibles associée à 90-95% à la protéine transthyréine (TTR) (Blomhoff et coll., 1991). Cette protéine présente un site de liaison avec une forte affinité pour la thyroxine, hormone thyroïdienne, et sa liaison avec la RBP permet d'éviter la filtration glomérulaire du complexe (revue dans Newcomer et Ong, 2000).

Des modalités diverses ont été proposées pour expliquer la manière dont les cellules cibles captent le rétinol. Ces hypothèses ont fait l'objet de discussions (revue dans Vieira et coll., 1995). La captation pourrait se faire grâce à des récepteurs cellulaires spécifiques de la RBP (Newcomer et Ong, 2000) ou de la TTR (Vieira et Schneider, 1993) ou bien encore de façon tout à fait indépendante de ces récepteurs (Blaner et Olson, 1994).

D'autres résultats suggèrent une participation active des CRBPI et CRBP II dans le passage trans-membranaire du rétinol. En effet, Sudaram et coll. (1998) ont suggéré que les récepteurs membranaires de la RBP et la CRBPI seraient capables d'interagir pour canaliser le passage de ligands hydrophobes de la RBP extracellulaire vers la CRBPI intracellulaire. Herr et coll. (1999) ont, quant à eux, montré que le transfert du rétinol à travers une membrane phospholipidique impliquait la CRBPI et la CRBP II par deux mécanismes distincts. Le transfert du rétinol par la CRBPI ferait intervenir des interactions de types collisionnelles entre la CRBPI et les lipides et/ou enzymes membranaires. En revanche, la CRBP II interviendrait dans un processus de diffusion passive du rétinol sans interagir directement avec des composants de la membrane.

## **I.4. Métabolisme**

### *I.4.1. Principales voies métaboliques*

Il existe au niveau des cellules cibles un métabolisme non oxydatif produisant des rétynyl ester, rétynyl-phosphate, 3-déhydrorétinol, ainsi qu'un métabolisme oxydatif produisant successivement du rétinol puis de l'acide rétinoïque (AR), métabolite considéré comme étant la forme « active » de la vitamine A sur l'expression génique. Ces voies métaboliques sont illustrées dans la **figure 3**. Le processus d'oxydation du rétinol, qui semble être l'étape limitante de la biosynthèse de l'AR (Ross et coll., 2001), comprend à la fois des voies cytosoliques et microsomales (revue dans Duester, 1996).

Au niveau cytosolique, la formation du composé intermédiaire, le rétinol, peut être catalysée par des alcool-déshydrogénases NAD-dépendantes (ADH) appartenant à la famille des MDR (Medium-Chain dehydrogenase/reductase) (Boleda et coll., 1993 ; Yang et coll., 1994 ; Ross et coll., 2001). Ces enzymes ont un large spectre de substrats dont font partie l'éthanol (Duester, 2000) et le rétinol sous sa forme non liée à CRBP (Ross et coll., 2001). Les différentes classes d'ADH impliquées dans cette première étape de synthèse de l'acide rétinoïque ne sont pas encore bien définies et il existe de nombreux candidats. Des études génétiques réalisées chez la souris indiquent le rôle prépondérant de deux ADH dans le métabolisme du rétinol, les ADH de classe I et de classe IV (Duester et coll, 2003).

Une seconde voie de métabolisation du rétinol en rétinaldéhyde a été mise en évidence : il s'agit d'une voie microsomale. Le rétinol lié à la protéine de liaison cytosolique CRBP est un substrat de deux déshydrogénases microsomales NADP(H) dépendantes, dénommées RoDH ou RDH, qui appartiennent à la famille des SDR («Short-Chain dehydrogenase/reductase») (revue dans Liden et coll., 2003). La contribution de ces deux voies dans la métabolisation du rétinol varie selon les auteurs : Napoli et coll. (1996) ont montré l'importance de la voie microsomale par rapport à la voie cytosolique ; en revanche, Duester (1996) privilégie la voie cytosolique pour l'oxydation du rétinol en rétinaldéhyde alors que la voie microsomale serait impliquée dans la réduction du rétinaldéhyde en rétinol favorisant ainsi le stockage de la vitamine A. De plus, Chen et coll. (2000) ont mis en évidence l'implication de cytochromes P450 dans la conversion du rétinol en rétinol.

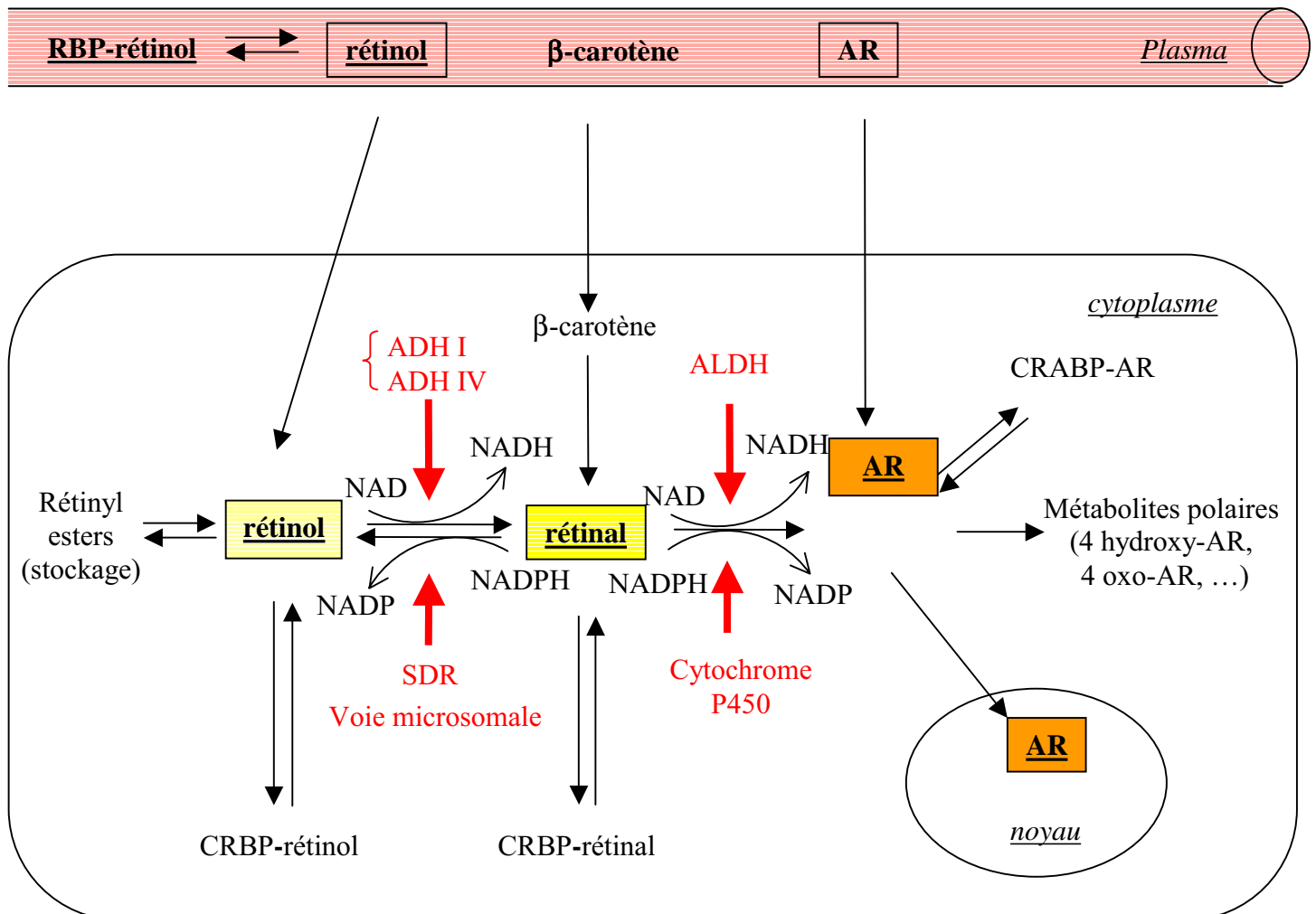


Le rétinaldéhyde peut ensuite être converti de manière irréversible en acide rétinoïque par des aldéhydes déshydrogénases (ALDH) cytosoliques de classe I (Chen et coll., 1994). Par la suite, certaines ALDH ont été identifiées comme étant spécifiques du rétinal (McCaffery et Dräger, 1995 ; Zhao et coll., 1996). Ainsi, des études *in vivo* montrent que la Raldh1 et la Raldh2 seraient également impliquées dans la synthèse d'acide rétinoïque (Duester, 2000 ; Duester, 2001). Par ailleurs, il a été montré au niveau des microsomes, que les isoformes 1A1, 1A2, 1B1 et 3A4 des cytochromes P450 humains peuvent oxyder le rétinal en acide rétinoïque (Zhang et coll., 2000).

L'acide rétinoïque (AR) peut être métabolisé en 4-hydroxy-AR, 4-oxo-AR, 18-hydroxy-AR. Cette oxydation, catalysée par une famille de cytochromes P450, la CYP26, spécifique de l'AR tout-*trans*, semble permettre la dégradation et l'élimination de l'AR et contribue ainsi au contrôle du signal rétinoïde (Napoli, 1999). De nombreux cytochromes P450 semblent être impliqués *in vitro* dans la formation des différents métabolites de l'AR, et ceci de manière spécifique (revue dans Marill et coll., 2003).

#### *1.4.2. Métabolisme cérébral*

Au niveau du cerveau, le transfert des substances circulant dans le sang est limité par un système de barrière entre le compartiment sanguin et le Système Nerveux Central (SNC) : il s'agit de la barrière hémato-encéphalique. De plus, au niveau des plexus choroïdes (site de production du liquide céphalo-rachidien ou LCR), la présence de jonctions serrées entre les cellules gliales crée une barrière physique qui empêche le passage de nombreuses molécules du sang vers le LCR. A notre connaissance, peu de données bibliographiques concernent le passage du rétinol à travers la barrière hémato-encéphalique. Il semblerait que ce transport nécessite la présence de CRBPI, protéine abondante dans les cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique et dans les plexus choroïdes (Zetterström et coll., 1994). Par ailleurs, les protéines RBP et TTR sont produites dans le liquide cérébro-spinal (Soprano et coll., 1985), la présence de la protéine RBP, seule ou complexée avec TTR, a été mise en évidence au niveau des plexus choroïdes et de la barrière hémato-encéphalique et cette



**Figure 3 : Métabolisme de la vitamine A**

ADH : alcool-déshydrogénases ; ALDH : aldéhyde-déshydrogénases ; AR : acide rétinoïque ; CRABP : "cellular retinoic acid binding protein" ; CRBP : "cellular retinol binding protein" ; RBP : "retinol binding protein" ; SDR : « Short-chain Deshydrogénases / reductases ».

(D'après Duester, 1996)

protéine pourrait contrôler l'entrée des rétinoïdes dans le cerveau (MacDonald et coll., 1990 ; Smeland et coll. 1995). De plus, la TTR a été détectée récemment dans l'hippocampe (Stein et Johnson, 2002). Une autre protéine, présente dans le cerveau, la prostaglandine D synthase, pourrait agir aussi comme un transporteur des rétinoïdes. En effet, cette protéine initialement identifiée comme la plus abondante du fluide cérébrospinal humain, est capable de lier certains rétinoïdes tels que l'acide rétinoïque, avec une affinité supérieure à celle d'autres protéines de la même famille comme la RBP (Urade et Hayaishi, 2000).

Comme nous l'avons décrit précédemment, le rétinol peut être transporté du foie vers le cerveau. Yamagata et coll., en 1993 ont montré le transport jusqu'au cerveau de l'AR injecté dans la cavité péritonéale. Par ailleurs, Kurlandsky et coll. (1995) ont montré que 90% de l'AR total du cerveau provient de l'AR plasmatique. La pharmacologie de l'acide rétinoïque a été, par la suite, clairement définie (Le Doze et coll., 2000) : parmi trois rétinoïdes administrés chez le rat, l'AR tout-*trans* est le plus largement transporté du sang au cerveau. L'origine de l'AR présent dans le cerveau semble donc essentiellement exogène dans des situations d'apports suffisants en vitamine A.

Par ailleurs, il est à noter qu'après le foie et le rein, le cerveau présente une concentration plus élevée d'AR que les autres organes étudiés. L'étude du transport de l'AR du sang vers les tissus cibles révèle que celui-ci n'est pas transporté préférentiellement vers le cerveau (Werner et Deluca, 2002). C'est pourquoi ces auteurs concluent que la formation d'AR à partir du rétinol est plus efficace dans le cerveau que dans les autres tissus de l'animal. De plus, l'identification des 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.

Dès 1994, Zetterström et coll. décrivent la distribution des CRBPI et CRABPI dans les différentes structures du cerveau de rat adulte. Par ailleurs, la présence de CRABPI et de CRABPII dans le striatum de l'animal adulte, ainsi que celle de CRBPI dans cette même structure au cours du développement (Ruberte et coll., 1993; Toresson et coll., 1999), suggèrent un rôle important des rétinoïdes dans le striatum à des stades embryonnaires mais aussi à l'âge adulte. Ce profil d'expression laisse aussi présager des fonctions essentielles des rétinoïdes dans le cerveau mature.

Les alcool déshydrogénases ADH I et ADH IV ont été identifiées dans diverses régions cérébrales telles que le cervelet, le cortex et l'hippocampe (Martinez et coll., 2001), l'ADH III étant l'isoforme majoritaire dans le cerveau (Galter et coll., 2003). Par ailleurs, les Raldh1, Raldh2 et Raldh3 ont été détectées dans le SNC: la Raldh1 et la Raldh2 sont présentes dans l'hippocampe alors que le striatum contient exclusivement la Raldh1 (McCaffery et Dräger, 1994). Il apparaît aujourd'hui que le striatum est la région du cerveau la plus riche en AR (Wagner et coll, 2002). De plus, il est à noter que le striatum, comme d'autres régions du cerveau telles que l'hippocampe et le cortex, est une structure particulièrement impliquée dans les processus mnésiques.

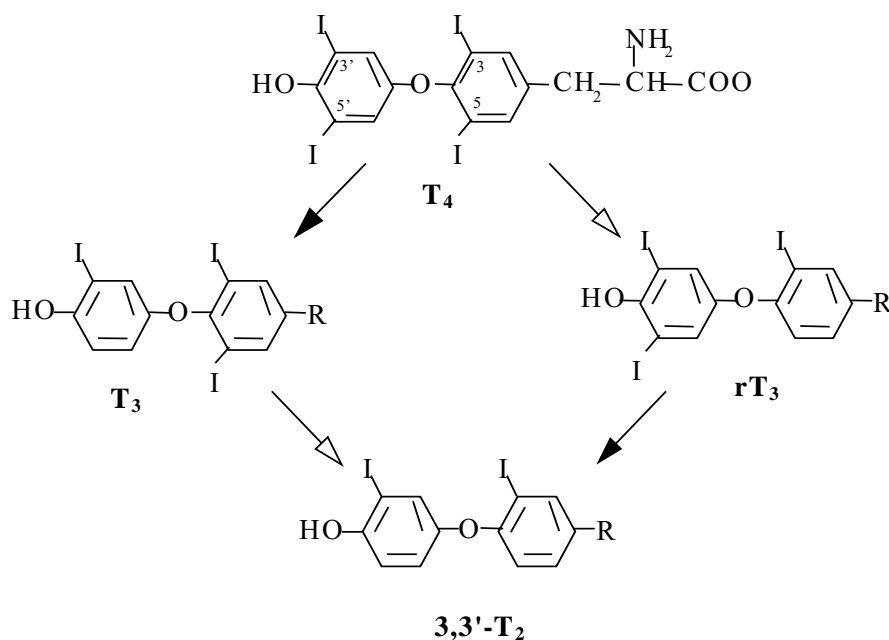
Outre la mise en évidence d'une localisation cérébrale des protéines de liaison des rétinoïdes et des enzymes intervenant dans le métabolisme, différentes études ont montré que l'AR peut être synthétisé *de novo* dans le cerveau adulte. C'est le cas notamment d'une étude *in vitro* qui a montré que les cellules OLN-93, modèles d'oligodendrocytes du SNC, expriment l'aldéhyde déshydrogénase Raldh2, et sont capables de synthétiser l'acide rétinoïque à partir de rétinol (Mey et Hammelmann, 2000). D'autres résultats montrent que l'AR peut être synthétisé à partir de rétinol ou de rétinaldéhyde dans des homogénats de cerveau adulte de lapin, et ceci à des taux comparables à ceux mesurés dans le foie (Dev et coll., 1993). Cette synthèse a également été mise en évidence dans le cerveau de souris adulte, et plus particulièrement dans le striatum, où la synthèse d'AR est beaucoup plus importante que dans l'hippocampe (McCaffery et Dräger, 1994). En 1997, Connor et Sidell révèlent que le métabolisme des rétinoïdes reste actif dans le cerveau humain mature. En effet, ils mettent en évidence la présence de rétinol et surtout de rétinyl ester dans l'hippocampe ; parallèlement, ils mesurent des activités rétinaldéhyde déshydrogénase dans différentes régions du cerveau comme l'hippocampe, le cortex frontal et pariétal.

## II. Données générales sur les hormones thyroïdiennes

### II.1. Définitions

La thyroïde est une glande endocrine impaire et médiane située dans la région sous-hyoïdienne du cou. Le fonctionnement de la glande thyroïde est principalement régulé par l'axe hypothalamo-hypophysaire, qui répond aux besoins des tissus périphériques en hormone thyroïdienne, et par l'apport iodé, dont résulte la disponibilité du substrat principal de la glande (revue dans Leclere et coll., 1992).

Les hormones thyroïdiennes (**figure 4**) sont des molécules lipophiles considérées comme des hormones clés dans la modulation de divers processus métaboliques (consommation d'oxygène, métabolisme des lipides, ...).



**Figure 4. Principales étapes de la désiodation de la thyroxine**

T<sub>4</sub> : thyroxine ; T<sub>3</sub> : triiodothyronine ; rT<sub>3</sub> : reverse T<sub>3</sub> ; 3,3'-T<sub>2</sub> : diiodothyronine.

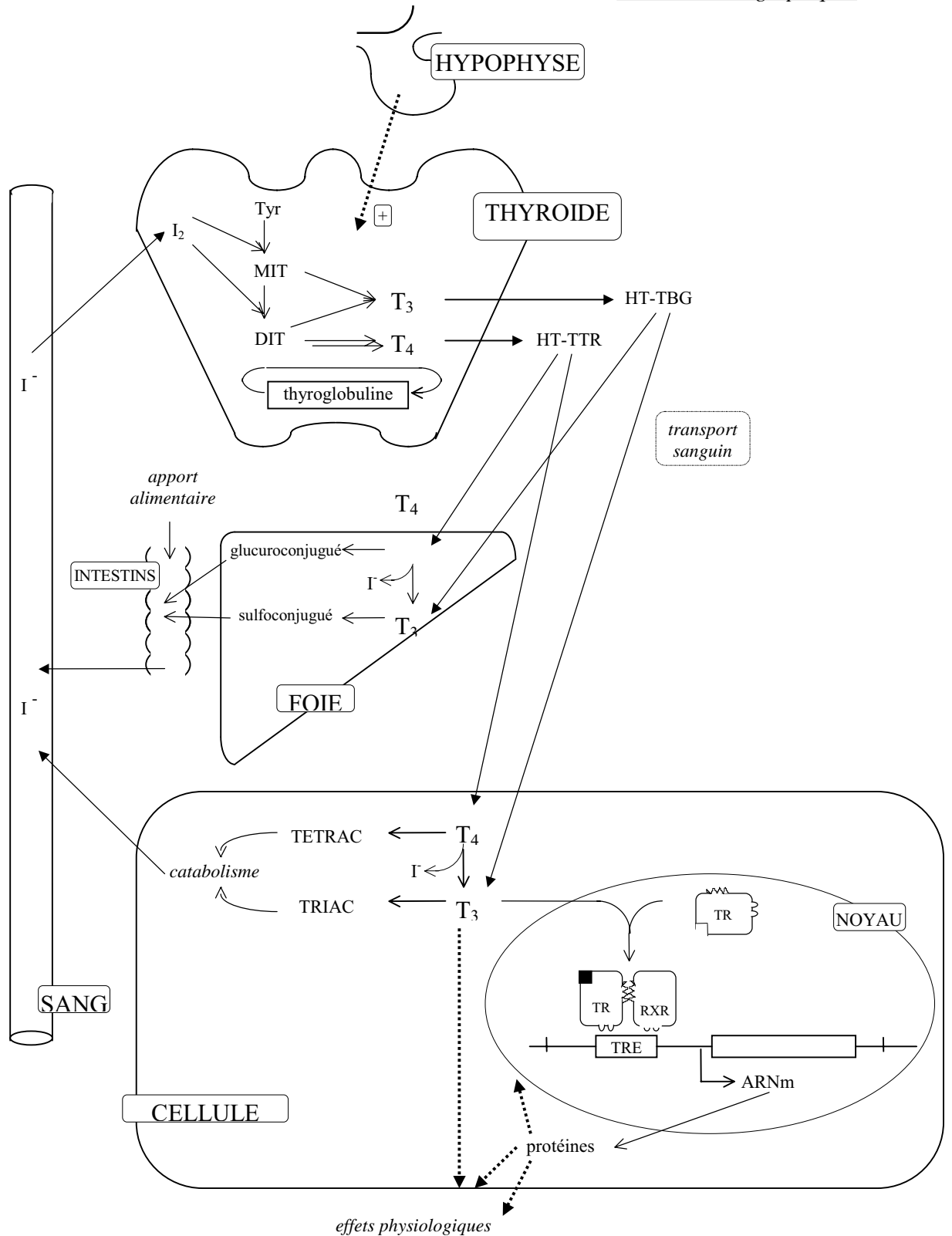
↘ : 5' désiodation ; ↙ : 5 désiodation

## **II.2. Biosynthèse**

La synthèse des hormones thyroïdiennes, illustrée **figure 5**, est assurée par les cellules folliculaires de la glande thyroïde, sous contrôle de l'hypophyse qui sécrète la thyroïdostimuline (TSH ou thyrotropine), elle-même régulée en amont par la thyrolibérine (TRH) de l'hypothalamus (revue dans Dumont et Vassart, 1995). Les deux formes principales synthétisées sont la 3,5,3',5'-tétraiodothyronine (T4 ou thyroxine) et la 3,5,3'-triiodothyronine (T3 ou triiodothyronine).

La majorité des hormones thyroïdiennes plasmatiques correspondent à la forme précurseur T4 : chez l'homme, le taux de T4 sérique est environ 40 fois supérieur à celui de T3 sérique (revue dans Yen, 2001). La T4 est considérée plutôt comme une prohormone, constituant un stock périphérique d'hormones thyroïdiennes. La T3 est l'hormone thyroïdienne la plus active (Samuels, 1983). La voie principale de production de T3, illustrée **figure 4**, met en œuvre une monodésiodation périphérique de T4 par des enzymes désiodases. La thyroxine exerce un rétrocontrôle négatif à la fois au niveau de l'hypophyse et de l'hypothalamus après avoir été transformée in situ en T3.

Dans le cerveau, de nombreuses études ont mis en évidence que plus de 80% de la T3 est produite à partir de la T4 par une 5' désiodation catalysée par la 5' désiodase de type II (revue dans Bianco et coll., 2002). Le maintien d'une concentration physiologique de T3 dans cet organe lors d'une élévation des taux sériques de T4 est permis *via* la transformation des hormones thyroïdiennes (T3 et T4) en formes inactives (rT2 et rT3, respectivement), par la désiodase de type III (revue dans Bernal et coll., 2003).



**Figure 5. Métabolisme, transport et mode d'action des hormones thyroïdiennes**

DIT : diiodothyrosine ; HT : hormones thyroïdiennes ;  $I^-$  : iodure ;  $I_2$  : iode moléculaire ; MIT : monoiodothyrosine ;  $T_3$  : 3,5,3'-triiodothyronine ;  $T_4$  : 3,5,3',5'-trétraiodothyronine ; TBG : "Thyroxin binding globulin" ; TETRAC : acide tétraiodothyroacétique ; TR : récepteur nucléaire de la triiodothyronine ; TRE : élément de réponse de la triiodothyronine ; TRIAC : acide triiodothyroacétique ; TSH : thyrostimuline hypophysaire ; TTR : transthyréline ; Tyr : tyrosine.

### **II.3. Transport**

Les hormones thyroïdiennes ne circulent dans le plasma que pour une très faible part à l'état libre (seulement 0,03 % de la T4 sérique), elles sont liées à des protéines sériques synthétisées par le foie (revue dans Yen, 2001). La part respective de chaque fraction protéique dans le transport des hormones thyroïdiennes varie selon les espèces. Ainsi la T4 est transportée pour 75% par la TBG (« thyroxin binding globulin ») chez l'homme alors que chez les rongeurs elle est transportée principalement par une préalbumine, la transthyréline (TTR) (revue dans Refetoff et Nicoloff, 1995). La TTR a aussi une localisation intracellulaire, elle aurait un rôle important dans la captation cellulaire des hormones thyroïdiennes grâce à des récepteurs spécifiques à la surface des cellules (Divino et Schuöler, 1990). Des données récentes concernant la captation cellulaire des hormones thyroïdiennes par les tissus cibles montrent l'implication de transporteurs membranaires dont le système L, qui permet également le transport d'acides aminés (Ritchie et coll., 2003).

La majorité de la T4 présente dans le cerveau provient directement du sang (Blay et coll., 1993 ; Cheng et coll., 1994). Les plexus choroïdes synthétisent la protéine de transport majoritaire des hormones thyroïdiennes, la TTR (Zheng et coll., 1999). Sa concentration élevée dans le liquide céphalo-rachidien suggère un rôle dans le transfert de la T4 du sang vers le cerveau via la barrière formée par les cellules des plexus choroïdes (Dickson et coll., 1987 ; Schreiber et coll., 1990 ; Blay et coll., 1993). Mais ce rôle de la TTR dans l'entrée de la T4 dans le cerveau reste controversé (Almeida et coll., 2000). D'autres travaux ont montré que la T3 et la T4 entrent dans le cerveau principalement via la barrière hémato-encéphalique pour se distribuer à travers l'ensemble du SNC, et via les plexus choroïdes pour une distribution plus spécifique (dans les cellules épendymaires et les organes périventriculaires) (revue dans Hennemann et coll., 2001).



## **II. Mode d'action cellulaire de la vitamine A et des hormones thyroïdiennes**

### **II.1. La superfamille des récepteurs nucléaires**

#### *II.1.1 Données générales*

Des données bibliographiques ont permis d'établir que les hormones thyroïdiennes et l'acide rétinoïque agissent dans les cellules cibles par l'intermédiaire de récepteurs nucléaires pour réguler l'expression de gènes spécifiques. Les récepteurs nucléaires sont des protéines, trans-régulatrices, capables de se fixer, généralement sous forme de dimères, au niveau de séquences spécifiques d'ADN, appelées éléments de réponse aux hormones HRE ("hormone response element"), situées en amont du promoteur de gènes cibles (occasionnellement dans des introns) et de moduler ainsi, en tant que facteurs de transcription, leur expression génique (revue dans Mangelsdorf et Evans, 1995). La caractérisation de ces récepteurs nucléaires, dont les premiers clonés furent le récepteur des glucocorticoïdes (GR) (Hollenberg et coll., 1985 ; Miesfield et coll., 1986) et le récepteur des œstrogènes (ER) (Green et coll., 1986), a permis de montrer la forte homologie de structure entre ces protéines et de les regrouper en une même superfamille de récepteurs nucléaires. Elle comprend des récepteurs pour différents ligands hydrophobes tels que les stéroïdes, les hormones thyroïdiennes, les dérivés hydroxylés de la vitamine D, l'acide rétinoïque (ce qui justifie d'assimiler les formes actives de la vitamine A et de la vitamine D à des hormones au point de vue de leur mode d'action) ou encore certains acides gras et éicosanoïdes. En plus de ces récepteurs dont les ligands sont connus (**Tableau I**), de nombreux travaux de clonage ont permis d'identifier des gènes inconnus jusqu'alors et homologues aux gènes codant pour les récepteurs nucléaires regroupés sous le terme de récepteurs orphelins (revue dans Willson et Moore, 2002).

La famille des récepteurs nucléaires, pour laquelle plus de 300 séquences ont été décrites, constitue ainsi la plus grande famille de facteurs de transcription connue chez les eucaryotes. Mangelsdorf et Evans (1995) ont divisé cette superfamille de récepteurs en quatre classes en fonction de leurs propriétés de liaison du ligand, de liaison à l'ADN et de dimérisation. La première classe comprend les récepteurs des hormones stéroïdes (récepteurs

**Tableau 1 : Quelques membres de la superfamille des récepteurs nucléaires des hormones**

Récepteurs avec ligand naturel		Récepteurs orphelins
AR	androgènes	EAR-1
ER	œstrogènes	EAR-2
GR	glucocorticoïdes	EAR-3 (COUP-T)
MR	minéralocorticoïdes	ERR-1
PR	progestérone	ERR-2
RAR $\alpha,\beta,\gamma$	acide tout- <i>trans</i> rétinoïque	HNF4
RXR $\alpha,\beta,\gamma$	acide 9- <i>cis</i> rétinoïque	NGF1B (NUR77)
TR $\alpha,\beta$	hormone thyroïdienne	TR2
VDR	1,25 dihydroxyvitamine D <sub>3</sub>	NURR1
PPAR	acides gras - éicosanoïdes	
*LXR $\alpha$	oxystérols	
*FXR	dérivés des farnésols	
*PXR	dérivés des prégnates	
*CAR $\beta$	androsténol	

Sur la gauche les récepteurs sont présentés avec le ligand naturel connu pour lequel ils ont la plus grande affinité. Sur la droite, sont listés les récepteurs orphelins dont les ligands, s'ils existent, n'ont pas encore été identifiés.

Abréviations : AR : récepteur des androgènes ; ER : récepteur de l'œstrogène ; GR : récepteur des glucocorticoïdes ; MR : récepteur des minéralocorticoïdes ; PR : récepteur de la progestérone ; RAR : récepteur de l'acide rétinoïque tout-*trans*; RXR : récepteur de l'acide 9-*cis* rétinoïque ; TR : récepteur de la triiodothyronine ; PPAR : récepteur des activateurs de prolifération peroxysomale ; VDR : récepteur de la vitamine D<sub>3</sub> ; EAR : récepteur apparenté à v-erbA ; ERR : récepteur apparenté au récepteur de l'œstrogène ; HNF4 : facteur nucléaire mis en évidence dans l'hépatocyte ; CAR $\beta$  : récepteur actif constitutivement ; TR2 : récepteur testiculaire ; Nur77 : clone de l'ADNc 3CH77 up-régulé par NGF ; Nurr1 : récepteur lié à Nur 1

\* anciens récepteurs orphelins dont les ligands ont été identifiés récemment

des glucocorticoïdes, androgènes, œstrogènes, minéralocorticoïdes et progestérone). Les récepteurs qui forment des hétérodimères avec les RXR (récepteurs de l'acide 9-*cis* rétinolique), forment la deuxième classe. Les classes III et IV regroupent des récepteurs qui se distinguent selon qu'ils se fixent à l'ADN sous forme d'homodimères ou de monomères ; la plupart des récepteurs orphelins appartiennent à ces deux sous-familles (Mangelsdorf et Evans, 1995 ; Giguere, 1997). Très récemment, une totale réorganisation de cette classification a été proposée avec pour objectif de clarifier la situation de ces nombreux récepteurs au sein de cette superfamille (Nuclear Receptor Nomenclature Committee, 1999 ; Duarte et coll., 2002). Dans cette nouvelle classification, les récepteurs de l'acide rétinolique tout-*trans* RAR et ceux des hormones thyroïdiennes TR sont regroupés dans la première sous-famille, alors que les RXR sont classés dans la deuxième.

### *II.1.2 Structure générale des récepteurs nucléaires*

Les récepteurs nucléaires présentent une forte homologie de structure (**figure 6**), avec quatre domaines principaux possédant divers degrés de conservation entre les différents membres de la superfamille (revue dans Aranda et Pascual, 2001).

- Le domaine A/B : impliqué dans la transactivation de manière indépendante du ligand, il 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, de 66 à 68 acides aminés, montre un fort degré d'homologie entre les différents membres de la superfamille. Deux motifs en doigt de zinc jouent un rôle dans les processus de liaison spécifique aux éléments de réponse situés dans le promoteur des gènes cibles (revue dans Mignotte, 1997). 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 et pourrait être impliquée dans la localisation nucléaire des récepteurs.
- Le domaine E : le domaine carboxyterminal possède une structure complexe, la plus longue en acides aminés. Il assure la fixation du ligand mais intervient également dans la dimérisation et la régulation de la transcription dépendante du ligand.

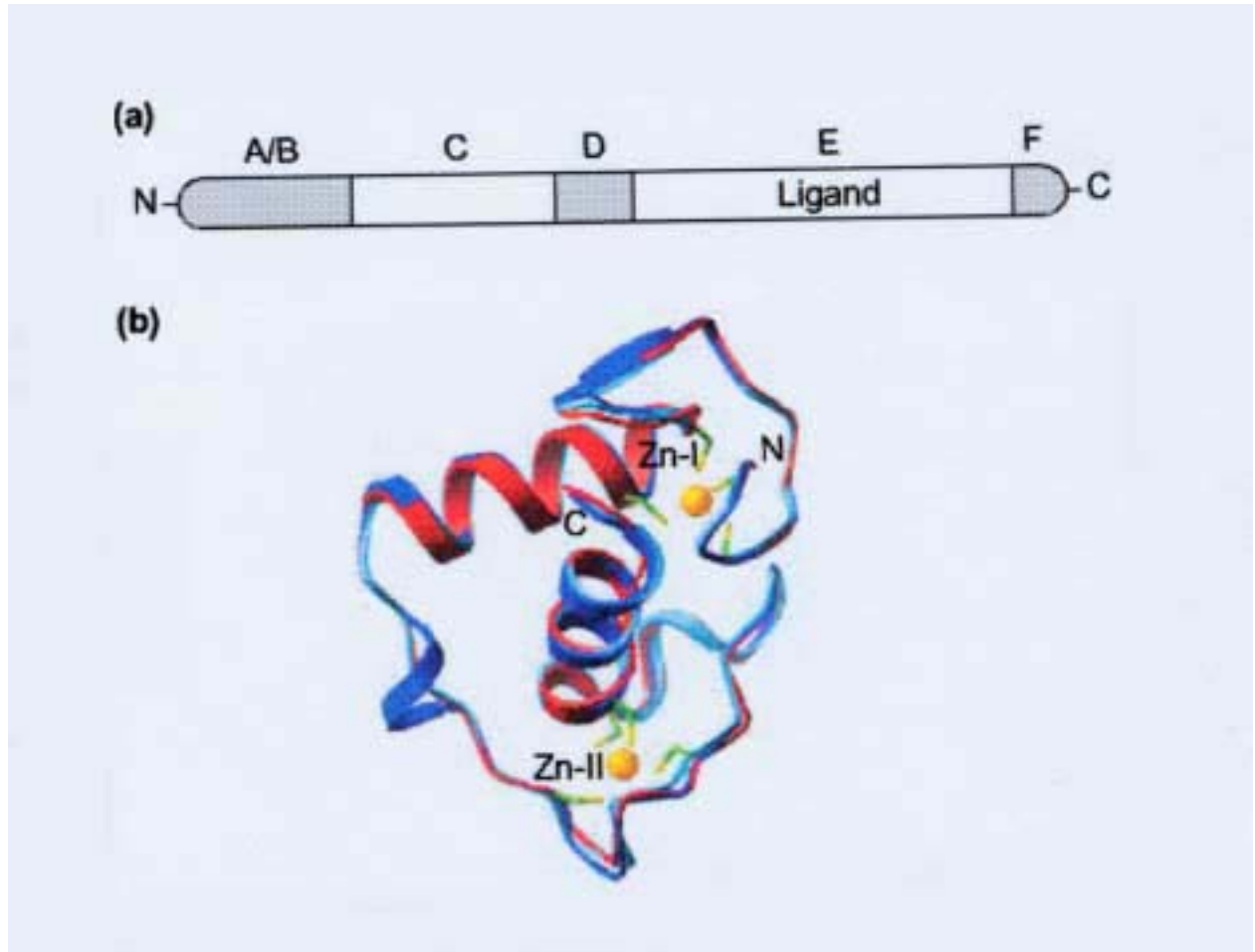
Certains membres de cette superfamille, c'est le cas des RAR, des récepteurs des œstrogènes ou encore des récepteurs des hormones thyroïdiennes, possèdent en plus une région F dont le rôle n'est pas encore bien élucidé ; certaines études montrent cependant une implication potentielle dans les interactions avec les corégulateurs et dans la régulation de l'activité transcriptionnelle (Koide et coll., 2002). Les RXR semblent être dépourvus de cette région (Parrado et coll., 2001).

### *II.1.3. Mode d'action nucléaire*

#### II.1.3.1. Les éléments de réponse

Les éléments de réponse aux hormones comprennent plusieurs types selon le ligand responsable de l'activation de la transcription (revue dans Fuller, 1991). Leur structure est généralement basée sur un même principe : deux  $\frac{1}{2}$  sites pour la plupart hexanucléotidiques, dérivés d'une séquence consensus qui leur est propre et combinés de manière palindromique ou directement répétée (DR) (mais parfois plus complexe), séparés de 1 à 5 nucléotides ou bien strictement contigus (Umesono et coll., 1991). Plusieurs motifs peuvent répondre à un même récepteur nucléaire, mais la liaison sera plus ou moins favorisée et la transcription sera régulée différemment.

Les éléments de réponse aux hormones thyroïdiennes (TRE) et à l'acide rétinoïque (RARE) situés dans le promoteur des gènes cibles lient plus facilement les dimères de récepteurs et donnent lieu à une meilleure activité transcriptionnelle avec des hétérodimères. L'hétérodimérisation la plus importante apparaît être la combinaison avec un autre membre de la superfamille des récepteurs nucléaires, les RXR (revues dans Rowe, 1997 ; et Rastinejad, 2001). Ces récepteurs de l'acide 9-*cis* rétinoïque constituent les coactivateurs communs de nombreux récepteurs nucléaires et jouent ainsi un rôle central dans la régulation de l'expression génique.



**Figure 6 : Architecture des récepteurs nucléaires**

- (a) Les différents domaines des récepteurs nucléaires (A-E/F)
- (b) Superposition des structures des domaines C du RXR (rouge), du RAR (cyan), et du TR (bleu). Chacun des deux ions de Zinc (orange) est lié à quatre atomes de soufre (jaune) appartenant à des cystéines conservées (vert). L'hélice  $\alpha$  qui reconnaît la plupart des séquences AGGTCA est mentionnée (hélice de reconnaissance).

D'après Rastinejad (2001).

### II.1.3.2 Rôle des cofacteurs de transcription

Les récepteurs nucléaires sont au centre d'un système complexe de régulation, et la fixation du ligand n'est pas toujours suffisante pour que le récepteur induise l'expression d'un gène (Katzenellenbogen et coll., 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. Depuis la découverte en 1995 des premiers cofacteurs (Chen et Evans, 1995, Lee et coll., 1995) le nombre de ces protéines ne cesse d'augmenter (revue dans Gelman et coll., 1997). 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.

L'activation des récepteurs nucléaires passe par l'action de ces cofacteurs (revue dans Rosenfeld et Glass, 2001). 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 (**figure 7**).

### *II.1.4 Interaction des récepteurs nucléaires*

L'hétérodimérisation ou l'homodimérisation des membres de la superfamille des récepteurs nucléaires entre eux ou avec le partenaire commun RXR permet un large spectre d'actions. On peut souligner l'étroite relation existant entre les voies d'action des rétinoïdes et des hormones thyroïdiennes qui contrôlent de nombreux gènes communs, parfois avec une action synergique. Les hétérodimères TR/RXR et RAR/RXR sont les principaux médiateurs de l'action transactivatrice de la triiodothyronine et de l'AR (Schröder et Carlberg, 1994 ; Giannini et coll., 1997 ; Kastner et coll., 1997 ; Chin et Yen, 1997). Leur présence diminue la liaison des TR/RAR à divers TRE et RARE (Yen et coll., 1992). Ainsi, la compétition pour l'élément de réponse DR-1 est responsable, en partie, des mécanismes d'interaction existants entre les différentes voies de signalisation impliquant ces récepteurs. Par ailleurs, il a aussi été

mis en évidence que les récepteurs orphelins interfèrent avec l'activité des récepteurs "classiques" (Wu et coll., 1997).

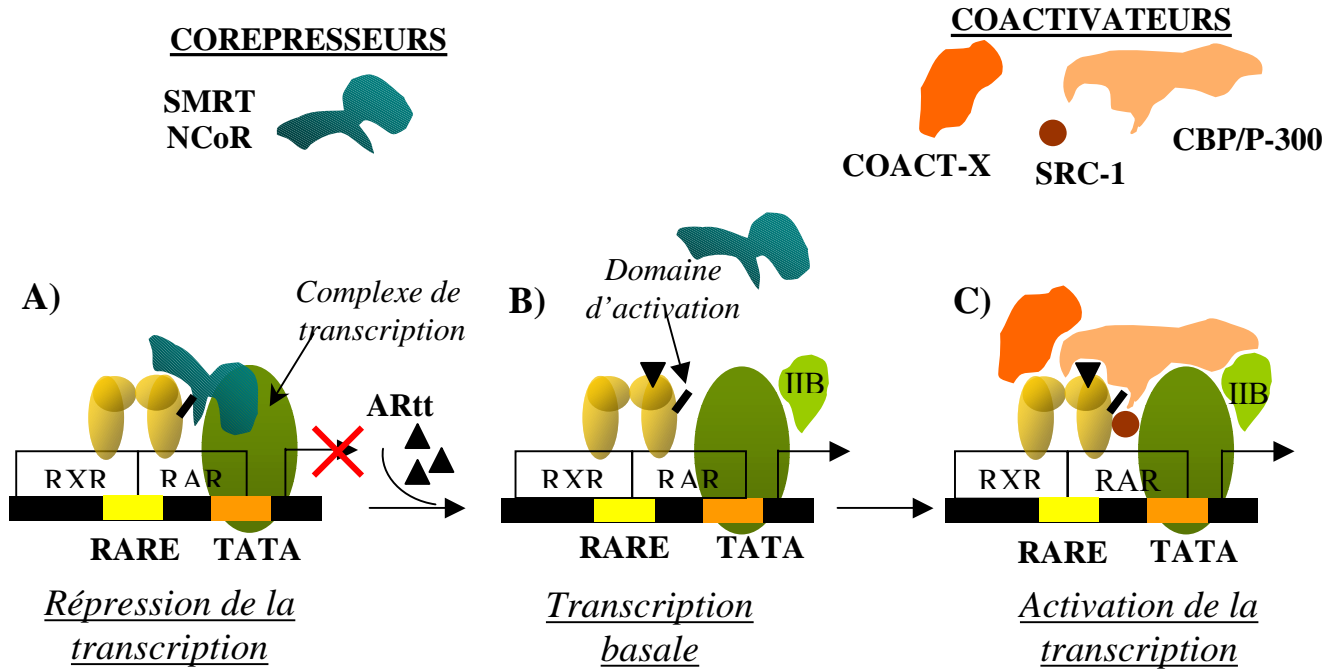
## *II.2 Les récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque*

### *II.2.2 Les différents récepteurs*

La complexité de la voie de signalisation de l'acide rétinoïque tient de l'existence d'une grande diversité de ses récepteurs nucléaires. Deux familles multigéniques codent pour les récepteurs nucléaires des rétinoïdes. La première de ces familles comprend des récepteurs de type RAR ("retinoic acid receptor") qui présentent une affinité élevée pour l'acide tout-*trans* rétinoïque (Ishikawa et coll., 1990 ; Yang et coll., 1991). La seconde famille code pour des récepteurs de type RXR ("retinoid X receptor") qui affichent une affinité plus élevée pour l'acide 9-*cis* rétinoïque (Heyman et coll., 1992 ; Levin et coll., 1992). Pour chacun de ces récepteurs, trois types de protéines ont été isolés, codés par trois gènes distincts : RAR $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et RXR $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  (revue dans Chambon, 1996). Les séquences d'acides aminés de ces trois types sont très similaires dans les domaines B, C, D et E mais différent dans les domaines A (et F). Seul le domaine C de liaison à l'ADN est très conservé entre les différentes classes de RAR et RXR. Chaque gène peut coder pour plusieurs isoformes essentiellement différentes au niveau de l'extrémité aminoterminal, suite à l'utilisation de deux promoteurs alternatifs ou résultant de l'épissage alternatif (Giguere, 1994 ; Chambon, 1996).

### *II.2.3 Distribution tissulaire*

De nombreux travaux ont eu pour objet l'étude de la répartition spatio-temporelle des récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque au cours du développement, dans l'espoir de pouvoir attribuer aux différents récepteurs des rôles particuliers (Lohnes et coll., 1994 ; Mendelsohn et coll., 1994).



**Figure 7. Modèle d'activation en deux étapes des récepteurs nucléaires**

ARtt : acide rétinoïque tout-*trans* ; CBP/P-300 : "CREB-binding protein" ; COACT-X : autres coactivateurs ; NcoR : "nuclear receptor co-repressor" ; RAR : récepteur de l'acide rétinoïque tout-*trans* ; RARE : élément de réponse à l'acide rétinoïque ; RXR : récepteur de l'acide rétinoïque 9-*cis* ; SMRT : "silencing mediator for retinoid- and thyroid-hormone receptors" ; SRC-1 : "steroid receptor co-activator".

(D'après Rosenfeld et Glass., 2001)



La distribution des différentes isoformes chez l'adulte est aussi spécifique (revue dans Wan, 1993), ainsi les transcrits du RAR $\alpha$  sont distribués dans l'ensemble des tissus, ceux de la forme  $\beta$  sont plutôt restreints au cerveau, foie, rein et poumons, tandis que ceux de la forme  $\gamma$  sont confinés à la peau et aux poumons.

L'expression du RXR $\alpha$  est forte dans le foie mais non négligeable dans les reins, poumons, rate et muscles. Par contre le RXR $\beta$  a une distribution ubiquitaire même s'il est faiblement exprimé dans le foie, l'intestin et les testicules. Enfin, RXR $\gamma$  a une expression réduite dans les muscles, cœur, foie, reins, cerveau et glandes surrénales (Cullingford et coll., 1998).

Différents travaux ont permis de préciser la distribution des récepteurs nucléaires des rétinoïdes (RAR, RXR) dans le cerveau adulte. Les techniques d'immuno-histochimie font apparaître que le taux le plus élevé de ces récepteurs a été observé dans le striatum, où les types RAR $\beta$  et RXR $\gamma$  sont les plus abondantes chez le rat et la souris (Krezel et coll., 1999 ; Zetterström et coll., 1999 ; Moreno et coll., 2004). Yamagata et coll. en 1993 avaient déjà mis en évidence l'expression majoritaire de l'isoforme RAR $\beta$  dans le cerveau mature de rat, principalement dans le cortex cérébral, le cervelet et le striatum, et à des taux très bas dans l'hippocampe. En revanche dans cette dernière structure, les récepteurs RAR $\alpha$ , RAR $\gamma$  et RXR $\beta$  ont été majoritairement identifiés (Krezel et coll., 1999 ; Zetterström et coll., 1999 ; Moreno et coll., 2004).

Les transcrits de RAR $\alpha$ , RAR $\gamma$ , RXR $\alpha$  et RXR $\beta$  sont ubiquitaires, alors que ceux des RAR $\beta$  et RXR $\gamma$  sont présents en particulier, comme pour leurs protéines, dans le striatum. Il est à noter que certaines localisations de ces protéines ne sont pas corrélées avec la distribution des transcrits correspondants (Krezel et coll., 1999). Ceci laisse supposer une régulation post-transcriptionnelle de ces récepteurs, contribuant à leur localisation spécifique dans le cerveau.

### II.3. Les récepteurs nucléaires de la triiodothyronine

#### *II.3.1 Les différents récepteurs*

Deux gènes codent pour les récepteurs nucléaires des hormones thyroïdiennes : l'un code pour le récepteur de type  $\alpha$  dont trois isoformes  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  et  $\alpha 3$  sont possibles à partir d'un épissage alternatif du transcrit primaire (revue dans Bernal et coll., 2003) ; l'autre s'exprime en une forme  $\beta$  (Weinberger et coll., 1986) comprenant deux isoformes  $\beta 1$  et  $\beta 2$  selon l'épissage alternatif réalisé (Hodin et coll., 1989). Récemment un nouveau type de récepteur, TR $\beta 3$ , a été détecté dans le foie et le rein de rat (Williams, 2000). Les TR  $\alpha 1$  et  $\beta 1$  constituent les formes majeures, et sont les principaux intermédiaires de l'action génique de la T3. L'isoforme  $\alpha 2$ , incapable de lier la T3, ne peut pas opérer de transactivation de gène malgré sa capacité de liaison aux TRE (Yen et Chin, 1994). Elle se comporte en fait comme un récepteur transdominant (Izumo et Mahdavi, 1988 ; Koenig et coll., 1989) et peut exercer, *in vitro*, un effet négatif sur la transcription (Flamant et Samarut, 2003).

#### *II.3.2. Distribution tissulaire*

Les TR $\alpha 1$  et  $\beta 1$  sont exprimés de manière ubiquitaire dans les tissus de rat, tandis que  $\beta 2$  est spécifique du lobe antérieur de l'hypophyse et de certaines zones de l'hypothalamus (Lazar, 1993 ; Yuan et Yang, 2000).

Puymirat et coll., en 1991, ont localisé les TR dans le cerveau de rat adulte par immunocytochimie : ces récepteurs sont présents dans les neurones, mais également dans les cellules gliales et dans les plexus choroïdes. Leur niveau d'expression est très élevé dans les bulbes olfactifs, l'hippocampe (et plus particulièrement le gyrus dentelé), dans le cortex et le noyau amygdalien. Dans le cerveau, la forme majoritairement exprimée est TR $\alpha$  (Bradley et coll., 1989). TR $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  sont distribués de manière ubiquitaire ; un niveau très élevé de leurs transcrits a été mis en évidence dans les bulbes olfactifs, l'hippocampe et le cortex (Bradley et

coll., 1989 ; Cook et Koenig, 1990). Dans le SNC adulte, l'isoforme TR $\beta$ 1 semble être exprimée majoritairement au niveau du cortex cérébral (Bernal, 2002).

#### **II.4. Régulation de l'expression des récepteurs et interactions entre les voies d'action des rétinoïdes et des hormones thyroïdiennes**

##### *II.4.1. Autorégulation des récepteurs*

L'expression de certains gènes codant pour les récepteurs de l'AR dépend de la concentration cellulaire en AR : c'est le cas des RXR $\alpha$ , RXR $\beta$  et RXR $\gamma$  (Wan et coll., 1994 ; Duprez et coll., 1996). De même l'expression de RAR $\beta$  est fortement induite par l'acide rétinoïque tout-*trans in vitro* (De Thé et coll., 1989) et *in vivo* (Haq et coll., 1991), sans modification de l'expression des types RAR $\alpha$  et RAR $\gamma$  (De Thé et coll., 1989 ; Kato et coll., 1992 ; Yamagata et coll., 1993). D'autres études *in vivo* ont confirmé ce phénomène d'autorégulation des récepteurs RAR $\beta$  et RXR $\beta/\gamma$  (Enderlin et coll., 1997a ; Husson et coll., 2003).

La régulation de l'expression des TR est spécifique de chaque isoforme ainsi que du type cellulaire. Dans l'hypophyse, la T3 diminue l'expression de TR $\beta$ 2 et de TR $\alpha$ 1, et augmente celle de TR $\beta$ 1. Dans les autres tissus, la T3 semble diminuer l'expression de TR $\alpha$ 1 sans affecter celle de TR $\beta$ 1 (revue dans Yen, 2001). Des études *in vivo* réalisées sur le cerveau ont mis en évidence une augmentation de l'expression des TR en réponse à l'administration de T3 (Husson et coll., 2003 ; Husson et coll., 2004), et notamment de TR $\beta$  (Lebel et coll., 1993).

En résumé, les données bibliographiques suggèrent que la synthèse de certains récepteurs de l'AR et de la T3 soit dépendante de la biodisponibilité des ligands dans les cellules cibles.

*II.4.2. Hétérorégulation des récepteurs et interactions des voies d'action des rétinoïdes et des hormones thyroïdiennes*

L'hétérodimérisation des récepteurs nucléaires permet des régulations croisées (hétérorégulation) entre différentes voies hormonales. Des études de génétique ont montré que le RAR ressemble plus au TR qu'au RXR. Ceci contribue à expliquer l'étroite relation entre ces deux voies en plus de l'interrelation créée par l'hétérodimérisation avec le RXR. En effet, les structures très proches des RAR et des TR expliquent leur capacité à lier et activer la transcription à partir de site de liaison à l'ADN commun. Le gène de l'hormone de croissance du rat est une parfaite illustration puisque celui-ci est sous le double contrôle de l'AR et de la T3 mais surtout, ces deux hormones médient leur action via un seul élément de réponse, initialement identifié comme un TRE et fonctionnant également comme un RARE (De Luca, 1991).

L'hétérorégulation entre ces deux voies de signalisation a été montrée aussi au niveau des récepteurs TR $\alpha$ 1, (Satyanarayana et coll., 1994) et TR $\beta$ 2 (Jones et coll., 1993), qui sont régulés positivement par l'AR. Les hormones thyroïdiennes quant à elles semblent contrôler les taux de RXR $\beta$  et RXR $\gamma$  (Mano et coll., 1993). Par ailleurs, des études récentes, réalisées au laboratoire sur des rats révèlent qu'une carence en vitamine A génère une altération de la voie d'action des hormones thyroïdiennes, et notamment une hypoexpression des récepteurs TR $\alpha\beta$  (Husson et coll., 2003, Husson et coll., 2004).

### **III- Rétinoïdes, hormones thyroïdiennes et physiologie du cerveau adulte**

#### **III.1. Implication des rétinoïdes dans le fonctionnement du cerveau adulte**

Le rôle de la vitamine A dans le développement du SNC est connu depuis longtemps, mais ce n'est que ces dernières années que les neurobiologistes se sont intéressés aux fonctions potentielles des rétinoïdes dans le cerveau adulte. En effet, la présence de "l'appareil biochimique" associé au métabolisme et au système de réponse de l'acide rétinoïque conforte l'idée que l'AR continue de jouer des rôles essentiels dans le cerveau adulte.

Ainsi, des données récentes ont permis d'établir un lien entre l'activité de la voie de signalisation de la vitamine A et les fonctions mnésiques dans le cerveau adulte. Une revue récente montre que la vitamine A intervient dans de nombreux processus neurobiologiques dans le cerveau adulte (Malik et coll., 2000). A titre d'exemple, une étude réalisée chez des souris invalidées pour les récepteurs  $RAR\beta$  et  $RAR\beta$ - $RXR\gamma$ , a montré une altération de la PLT dans l'hippocampe ainsi qu'un déficit d'apprentissage spatial (Chiang et coll., 1998). Des déficits comparables ont été observés chez des animaux carencés en vitamine A (Misner et coll., 2001 ; Cocco et coll., 2002 ; Etchamendy et coll., 2003).

De plus, comme nous venons de le voir, l'acide rétinoïque est impliqué dans la régulation de plusieurs gènes codant pour des protéines impliquées dans la plasticité synaptique (tTG, GAP-43, RC3). Parmi les autres gènes cibles de l'AR dans le cerveau (**Tableau II**), on trouve notamment ceux des récepteurs DR2 de la dopamine (Samad et coll., 1997), de protéines impliquées dans la transmission cholinergique (Castell et coll., 2002), du facteur de croissance nerveux NGF et ceux des récepteurs des différentes neurotrophines (NGF, BDNF, NT-3) (Scheibe et Wagner, 1992 ; Mey et Rombach, 1999 ; Fiorentini et coll., 2002). La régulation de ces gènes confère aux rétinoïdes non seulement un rôle dans la croissance des neurites (Prince et Carlone, 2003), mais aussi dans l'efficacité de la transmission synaptique, la plasticité synaptique et la mémoire (Schinder et Poo, 2000 ; Brandner et coll., 2000 ; Ikegaya et coll., 2002). D'autres gènes régulés par l'AR ont des rôles bien connus dans la plasticité synaptique et les processus mnésiques : le récepteur N-méthyl-

D-aspartate (NMDA) (Beczowska et coll., 1996) ou la kinase  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM dépendante CaMKII (Chen et Kelly, 1996), par exemple.

D'autres part, plusieurs données de la littérature suggèrent un lien possible entre des dérégulations des voies de signalisation des rétinoïdes et des pathologies neurologiques. Ainsi, des études génétiques, ont permis de mettre en évidence un lien potentiel de cause à effet entre des dérégulations des voies de signalisation des rétinoïdes et la schizophrénie (revue dans Goodman, 1998). Plus récemment la même équipe a également suggéré un lien entre un transport défectueux de l'acide rétinoïque vers le cerveau et le développement de la maladie d'Alzheimer (Goodman et Pardee, 2003).

**Tableau II: Exemples de gènes régulés par l'acide rétinoïque dans le cerveau**

Sigle	dénomination	régulation	références
CRABPI	Protéine cytoplasmique de liaison de l'AR de type I	+	Leonard et coll., 1995
CRABPII	Protéine cytoplasmique de liaison de l'AR de type II	+	Plum et Clagett-Dam, 1995
RAR $\alpha$	Récepteur nuc. $\alpha$ de l'AR	+	Wuarin et coll., 1994
RAR $\beta$	Récepteur nuc. $\beta$ de l'AR	+	Yamagata et coll., 1993
RXR $\alpha$	Récepteur nuc. $\alpha$ de l'acide 9- <i>cis</i> rétinoïque	+	Wan et coll., 1994
RXR $\beta$	Récepteur nuc. $\beta$ de l'acide 9- <i>cis</i> rétinoïque	+	Jones et coll., 1993
RXR $\gamma$	Récepteur nuc. $\gamma$ de l'acide 9- <i>cis</i> rétinoïque	-	Wan et coll., 1994
TR $\beta$ 2	Récepteur nuc. $\beta$ 2 de la triiodotyronine	+	Jones et coll., 1993
SMRT	Co-répresseur RAR et TR	+	Bernadini et coll., 1997
GH	Hormone de croissance	+	Bedo et coll., 1989
P75 <sup>NGFR</sup>	Récepteur du facteur de croissance nerveux	+	Scheibe et Wagner, 1992
P <sup>55</sup> TNFR	Récepteur du facteur de nécrose tumorale	+	Chambaut-Guerin et coll., 1997
NGF	Facteur de croissance nerveux	+	Wion et coll., 1987
RNMDA	Récepteur du N-méthyl-D-aspartate	+	Beczowska et coll., 1996
ChAT	Choline acétyl-transférase	+	Kobayashi et coll., 1994
VACHT	Transporteur de l'acétyl-choline aux vésicules	+	Berse et Blusztajn, 1995
DR2	Récepteur à la dopamine	+	Farooqui et coll., 1994
Calbindin D28K	Protéine de liaison du calcium	+	Wang et Christakos, 1995
RC3	Neurogranine	+	Iñiguez et coll., 1994
P38	Synaptophysine	+	Gaetano et coll., 1992
CaMKII	Calmoduline kinase II	+	Chen et Kelly, 1996
tTG	Transglutaminase tissulaire	+	Chiocca et coll., 1989
GAP-43	Neuromoduline	+	Encinas et coll., 2000
CN	Calcineurine	-	Spannaus-Martin et Martin, 2000
APP	Précurseur du peptide $\beta$ -amyloïde	+	Beckman et Iverfeldt, 1997
BACE	$\beta$ -sécrétase de l'APP	+	Satoh et Kuroda, 2000
$\tau$	Protéine tau	+	Heicklen-Klein et coll., 2000

**III.2. Implication des hormones thyroïdiennes dans le fonctionnement du cerveau adulte**

Les hormones thyroïdiennes sont essentielles pour la maturation du cerveau normal (revues dans Bernal et Nunez, 1995 ; et dans Smith et coll., 2002). Si le rôle des hormones thyroïdiennes durant le développement est de nos jours relativement bien défini, leur intervention dans le fonctionnement du cerveau mature est en revanche moins bien connue. Toutefois, plusieurs arguments suggèrent que ces hormones jouent des rôles fonctionnels essentiels dans le cerveau adulte.

En effet, les récepteurs nucléaires aux hormones thyroïdiennes sont fortement exprimés et distribués de façon spécifique dans les différentes régions du cerveau adulte (Bradley et coll., 1989), et le taux d'hormones thyroïdiennes est non négligeable dans le système nerveux central (Joffe et Sokolov, 1994). Plusieurs auteurs ont émis l'hypothèse que les hormones thyroïdiennes pourraient agir comme des neurotransmetteurs dans le système nerveux central (Masson et coll., 1993 ; Dratman et Gordon, 1996). En effet, les hormones thyroïdiennes sont préférentiellement localisées dans les terminaisons synaptiques (Masson et coll., 1993) et peuvent moduler l'activité des récepteurs GABA (Martin et coll., 1996), et NMDA (Lee et coll., 2003). Par ailleurs, des données de la littérature sont en faveur d'une implication des hormones thyroïdiennes dans la plasticité cérébrale (Calzà et coll., 1997), et dans les processus de plasticité synaptique au niveau de l'hippocampe (Tang et coll., 2001 ; Gerges et coll., 2001 ; Gilbert, 2004).

D'autre part, des études cliniques ont montré, chez des individus adultes, l'apparition de troubles neurologiques et psychiques en condition d'hypothyroïdie ou d'hyperthyroïdie (Yiannakouris et Valcana, 1994 ; revue dans Smith et coll., 2002 ; Tremont et coll., 2003 ).



**Tableau III: Exemples de gènes régulés par la triiodothyronine dans le cerveau**

Sigle	dénomination	régulation	références
	$\beta - \gamma$ Actine	+	Sarkar et al., 1997
DYN	Dynorphine	-	Giardino et al., 1995
ENK	Enképhaline	-	Giardino et al., 1995
NGF	Facteur de croissance nerveux	+	Alvarez-Dolado et al., 1994
BDNF	Facteur de neurotrophine dérivé du cerveau	+	Giardino et al., 1995
BTEB	Protéine liant les éléments de transcription	+	Cayrou et al., 2002
<i>Srg1</i>	Protéine apparentée à la synaptogamine	+	Thompson, 1996
MAG	Glycoprotéine associée à la myéline	+	Rodriguez-Peña et al., 1993
hGH	Hormone de croissance de l'homme	-	Zhang et al., 1992
rGH	Hormone de croissance du rat	+	Glass et al., 1987
N-CAM	Molécule d'adhérence cellulaire	-	Thompson et al., 1987
RC3	Neurogranine	+	Iñiguez et al., 1993
NT3	Neurotrophine 3	+	Lindholm et al., 1993
PGD2	Prostaglandine D2 synthase	+	Garcia-Fernandez et al., 1993
MBP	Protéine basique de la myéline	+	Strait et al., 1997
PLP	Protéines protéolytiques	+	Muñoz et al., 1991
p58-M1	Pyruvate kinas pituitaire	+	Ashizawa et al., 1992
RXR $\beta$	Récepteur nuc. $\beta$ de l'acide 9- <i>cis</i> rétinolique	+	Mano et al., 1993
RXR $\gamma$	Récepteur nuc. $\gamma$ de l'acide 9- <i>cis</i> rétinolique	+	Mano et al., 1993
CRABPI	Protéine cytosolique de liaison de l'AR de type I	-	Wei et al., 1997
TR $\beta$	Récepteur nuc. $\beta$ de la triiodothyronine	+	Lebel et al., 1993
TRH	Thyrolibérine	-	Koller et al., 1987
TSH	Thyrotropine (s.u. $\alpha$ et $\beta$ )	-	Wondisford et al., 1989
Pcp2	Protéine 2 de cellules de Purkinje	+	Zou et al., 1994
DII	5'-désiodase de type II	-	Burmeister et al., 1997
	Cycline D2	+	Poguet et al., 2003
PC2	Glycoprotéine de pore nucléaire	+	Martel et al., 2002
c-myc		-	Perez-Juste et al., 2000
Rhes	Homologue de Ras, enrichi dans le striatum	+	Vargiu et al., 2001

**III.3. Gènes cibles des rétinoïdes et des hormones thyroïdiennes, impliqués dans la plasticité synaptique et étudiés dans ce travail de thèse**

*III.3.1. Quelques données sur la plasticité synaptique et la potentialisation à long terme (PLT)*

Dans le système nerveux central, on entend par "plasticité", 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 et Shvaloff, 1995).

Les modifications de la plasticité synaptique peuvent se traduire en électrophysiologie par le phénomène "Hebbien" de potentialisation à long terme ou PLT. 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. Ainsi l'induction d'une PLT traduirait de nombreuses modifications morphologiques post-synaptiques, telles qu'une élongation des épines dendritiques, un accroissement des zones actives et la formation de nouveaux contacts dendritiques. Ce phénomène est étudié pour mieux appréhender les processus neurobiologiques qui sous-tendent les processus mnésiques (revue dans Bliss et Collingridge, 1993).

*III.3.2. Gènes cibles des rétinoïdes et des hormones thyroïdiennes, étudiés dans ce travail de thèse*

Pour mieux comprendre l'intervention de la vitamine A et des hormones thyroïdiennes dans le cerveau adulte et plus particulièrement dans les mécanismes qui sous-tendent la plasticité synaptique et les processus mnésiques, nous avons choisi d'étudier, à titre de marqueurs, plusieurs gènes cérébraux dont l'expression est modulée par l'AR et/ou la T3.

### III.3.2.1. La transglutaminase tissulaire (tTG)

La transglutaminase tissulaire (tTG) est un bon indicateur, *in vivo*, de l'action des rétinoïdes (Verma et coll., 1992). En effet, un élément de réponse à l'AR a été mis en évidence dans le promoteur de son gène (Nagy et coll., 1996).

La transglutaminase tissulaire (ou de type II) est une enzyme multifonctionnelle, ubiquitaire, qui possède deux fonctions biologiques distinctes : elle est dotée d'une activité transaminase  $\text{Ca}^{2+}$  dépendante (création de ponts irréversibles entre les protéines) (Lorand et Graham, 2003) et possède également les propriétés d'une protéine G (Im et coll., 1997), impliquée dans la voie de signalisation médiée par le récepteur adrénergique  $\alpha 1$ .

L'intervention de cette enzyme dans les processus neurobiologiques n'est pas encore bien établie. Cependant, nous pouvons souligner que de nombreuses données bibliographiques soutiennent l'idée d'une intervention de la tTG dans les processus de plasticité synaptique. Dans le cerveau, elle a été identifiée dans différentes structures telles que le cortex, le striatum et l'hippocampe. Largement distribuée dans les terminaisons présynaptiques (Maggio et coll., 2001), la tTG semble contrôler la libération de neurotransmetteur au niveau des synapses, affectant ainsi l'activité neuronale (Ashton et Dolly, 1997). Plusieurs auteurs rapportent un rôle de l'activité transaminase de la tTG dans la différenciation neuronale et la croissance des neurites dans des neuroblastes (Tucholski et coll., 2001 ; Singh et coll., 2003). Concernant la plasticité synaptique, un premier travail en 1991 montrait une augmentation de l'activité de la tTG au cours des phénomènes de potentialisation à long terme (Friedrich et coll., 1991). Enfin, des données récentes sont en faveur d'une implication de la tTG dans les mécanismes physiopathologiques responsables de maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer, de Parkinson ou encore de Huntington (revues dans Lesort et coll., 2000 ; et dans Kim et coll., 2002).

### III.3.2.2. La neuromoduline (GAP-43)

Des données cohérentes mettent en évidence une régulation de GAP-43 par les rétinoïdes *in vitro* (Anderson et coll., 2001, Grummer et coll., 2000) et *in vivo* (Husson et coll., 2004).

La neuromoduline ou GAP-43 (« growth associated protein 43 ») est une protéine de 23,6 kDa, spécifique des neurones et substrat de la PKC, très abondante dans les cônes de croissance de l'axone (Gerendasy et Sutcliffe, 1997), et présente dans les corps cellulaires et dans les dendrites de certains neurones (Paradies et Steward, 1997). La distribution spatio-temporelle de GAP-43 est en accord avec ses fonctions au cours du développement et de la maturation du SNC. GAP-43 joue un rôle-clé dans le contrôle de la croissance des axones (Piontek et coll., 2002 ; Shen et coll., 2002) et dans la régénération axonale chez l'adulte (Chen et coll., 2001). Principalement exprimée dans les terminaisons pré-synaptiques elle serait impliquée dans la plasticité synaptique, après phosphorylation par la PKC, notamment en affectant la libération de neurotransmetteurs (Benowitz et Routtenberg, 1997). Par ailleurs, sa phosphorylation augmente après induction de la PLT (Ramakers et coll., 2000). D'autres travaux ont montré, chez des souris mutantes surexprimant GAP-43, l'augmentation de la PLT dans des coupes d'hippocampe (Hulo et coll., 2002). Il a aussi été montré une corrélation entre le niveau d'expression de GAP-43 et les performances d'apprentissage (Routtenberg et coll., 2000 ; Quattrone et coll., 2001).

#### III.3.2.3. La neurogranine (RC3)

Plusieurs études ont montré que l'expression de RC3 *in vivo* et *in vitro* est soumise à un réseau de signaux incluant les rétinoïdes (Iñiguez et coll., 1994 ; Enderlin et coll., 1997a) et les hormones thyroïdiennes (Guadaño-Ferraz et coll., 1997 ; Martinez et coll., 1999).

La neurogranine ou (RC3) est une protéine de 7,4 kDa spécifique des neurones, substrat de la PKC (Shakravarthy et coll., 1999), fortement exprimée dans la densité post-synaptique des épines dendritiques (Watson et coll., 1994), et appartenant à la même famille de protéine que GAP-43 (Gerendasy et Sutcliffe, 1997). Les propriétés biochimiques, l'expression et la localisation de la neurogranine suggèrent un rôle majeur de cette protéine au niveau de la synaptogénèse et de la plasticité neuronale. Il a été émis l'hypothèse que la phosphorylation de RC3 par l'activation de la PKC, entraînant une mobilisation calcique interne, serait un des mécanismes d'induction de la PLT (Gerendasy et Sutcliffe, 1997). Par ailleurs, le maintien de la PLT permet une augmentation de la phosphorylation de RC3 (Chen et coll., 1997). D'autres auteurs ont montré que l'injection, dans des cellules d'hippocampe, d'anticorps dirigés contre RC3 abolissait le maintien de la PLT (Fedorov et coll., 1995). Plus

récemment, il a été montré que la délétion du gène de RC3 altère la PLT et provoque des déficits d'apprentissage (Pak et coll., 2000).

## **B. RETINOÏDES ET HORMONES THYROÏDIENNES AU COURS DU VIEILLISSEMENT CEREBRAL**

### **I. Quelques généralités sur le vieillissement**

Selon une définition souvent proposée (Forette et coll., 1996), le vieillissement est «l'ensemble des modifications dont un organisme est l'objet depuis sa conception, son développement embryonnaire, sa maturation, sa vie adulte jusqu'à sa mort». L'absence de différenciation entre le développement et le vieillissement n'est pas admise par tous et une autre définition caractérise la sénescence comme «une détérioration non réversible prédisposant les organismes âgés à l'augmentation d'incidence de maladies fatales et à la mort» (revue dans Troen, 2003).

*« Aging seems to be the only available way to live a long life »*

*(Daniel François Esprit Auber)*

Plusieurs théories ont été proposées pour expliquer le vieillissement (revue dans Troen, 2003). (i) Les théories génétiques considèrent que le vieillissement s'inscrit dans un processus génétiquement programmé de développement et de maturation. C'est ainsi que l'existence d'une programmation génétique du vieillissement a été avancée dès 1961, lorsque Hayflick et Moorhead ont montré que les cellules fibroblastiques en culture avaient une capacité de réplication limitée. (ii) Les théories impliquant le stress oxydatif suggèrent qu'une grande partie des modifications apparaissant au cours du vieillissement serait due à des dommages moléculaires engendrés par les radicaux libres. (iii) La théorie immunologique est basée sur deux observations principales : un déclin des fonctions de défenses immunitaires au cours du vieillissement, associé une augmentation des phénomènes auto-immunitaires. (iv) La théorie neuroendocrinienne suggère quant à elle qu'un déclin des fonctions hormonales jouerait un rôle central dans le processus de vieillissement.

## **II. Le vieillissement cérébral**

Le cerveau est l'un des organes les plus touchés par la sénescence. Dans le contexte actuel du vieillissement de la population des pays occidentaux, l'étude de la sénescence cérébrale devient un axe majeur des recherches dans le domaine de la santé publique. En effet, l'incidence de la démence est de nos jours d'environ 5% de la population âgée de plus de 65 ans, et de plus de 50% pour les plus de 85 ans (Dugué et coll., 2003).

On peut décrire le vieillissement du cerveau à plusieurs niveaux. Au plan systémique, il se manifeste par une diminution des facultés d'adaptation, une baisse des capacités mnésiques, ... A un niveau anatomique, on peut observer une atrophie cérébrale et une dilatation ventriculaire (revue dans Anderton, 2002). Ces modifications sont souvent hétérogènes selon les individus (Sullivan et coll., 2001). Au plan cellulaire, le vieillissement se traduit par des modifications morphologiques, des pertes cellulaires et par des altérations de plasticité synaptique (Watson et coll., 2002 ; Rosenzweig et Barnes, 2003).

Dans ce contexte, nos travaux privilégient une hypothèse qui suggère l'intervention des rétinoïdes et des hormones thyroïdiennes dans les altérations de la plasticité synaptique et la genèse des troubles mnésiques du sujet âgé.

## **III. Les statuts vitaminique A et thyroïdien au cours du vieillissement cérébral**

### **III.1. Vieillessement et biodisponibilité de la vitamine A**

Les données générales (physiologiques) concernant les relations entre le statut vitaminique A et le vieillissement sont à ce jour plus descriptives qu'explicatives. Au cours du vieillissement les modifications du métabolisme de la vitamine A se caractérisent notamment par des concentrations élevées dans le foie, chez l'homme (McLaren et coll., 1979), chez le rat (van der Loo et coll., 2004) et chez la souris (Sundboom et Olson, 1984).

Plus précisément, l'activité hépatique de l'ARAT (enzyme responsable de l'estérification du rétinol en rétinyl esters) augmente avec l'âge, alors que l'activité enzymatique d'hydrolyse des rétinyl esters diminue (Mobarhan et coll., 1991). L'expression de la CRBP (protéine de transport du rétinol) et des cytochromes P450 (enzymes impliquées dans le métabolisme de l'AR) est également modifiée au cours du vieillissement (Mobarhan et coll., 1991 ; Yamamoto et coll., 2000).

Le statut vitaminique A n'est pas seulement caractérisé par le niveau des réserves hépatiques, mais aussi par la capacité de l'organisme à transporter et à utiliser efficacement le rétinol. Ces capacités sont altérées au cours du vieillissement (Azaïs-Braesco et coll., 1995). Nous verrons par la suite que les modifications concernent aussi l'action nucléaire de l'acide rétinoïque.

### **III.2. Vieillessement et statut thyroïdien**

Avec l'âge plusieurs fonctions de l'axe hypothalamo-hypophysaire sont altérées. Le vieillissement provoquerait en premier lieu une diminution du taux de dégradation des hormones, puis la mise en jeu de boucles de régulation («feed-back») négative induirait une diminution du taux de sécrétion de ces mêmes hormones. La chronologie de ces changements permet de comprendre les résultats parfois divergents obtenus lors du dosage des hormones thyroïdiennes circulantes chez des sujets âgés. Le niveau de T3 sérique semble être inversement corrélé avec l'âge. Par contre, le taux de T4 apparaît soit diminué (Monzani et coll., 1996), soit augmenté, soit inchangé (revue dans Smith et coll., 2002). La diminution de la production de T3, plus nette chez les mâles (Corrêa da Costa et coll., 2001), résulterait de la réduction de l'activité de la 5'désiodase assurant la conversion de T4 en T3 (Corrêa da Costa et Rosenthal, 1996 ; Magri et coll., 2002). Par ailleurs, la concentration hypothalamique en TRH est diminuée au cours du vieillissement (Solomon et coll., 1991). Les résultats concernant TSH sont quant à eux contradictoires : des résultats obtenus chez l'homme ont montré soit une augmentation (Mooradian et Wong, 1994), soit une baisse significative (Elmlinger et coll., 2003 ; Magri et coll., 2002), alors que chez le rat le taux de TSH semble être inchangé (Corrêa da Costa et coll., 2001).



Le vieillissement a des répercussions sur la glande thyroïde et sur l'axe hypothalamo-hypophysaire, mais entraîne aussi une diminution de la «sensibilité» des tissus cibles aux hormones thyroïdiennes (revue dans Mooradian, 1995). Il est aujourd'hui admis que la plupart des troubles thyroïdiens décrits chez les personnes âgées relèvent d'un statut d'hypothyroïdie (Finucane et Anderson, 1995). Etant donné l'implication des hormones thyroïdiennes dans les fonctions mnésiques, l'hypothyroïdie associée au vieillissement doit avoir des conséquences préjudiciables sur les processus neurobiologiques.

#### **IV. Actions cellulaires des rétinoïdes et des hormones thyroïdiennes au cours du vieillissement**

Les altérations métaboliques associés au vieillissement pourraient être à l'origine d'une baisse de la biodisponibilité de l'AR et de la T3, et par voie de conséquence de l'activité de leurs voies de signalisation dans les tissus cibles. C'est pourquoi, nous allons présenter plus en détail l'effet du vieillissement cérébral sur ces voies de signalisation (récepteurs nucléaires et gènes cibles).

Des études antérieures, réalisées dans l'Unité de Nutrition et Signalisation Cellulaire, ont mis en évidence une diminution de l'expression des ARNm codant pour les récepteurs nucléaires de l'AR (RAR $\beta$ , et RXR $\beta/\gamma$ ) et de la T3 (TR $\alpha\beta$ ) au cours du vieillissement : dans le foie de rat (Pallet et coll., 1997), dans le cerveau de souris (Enderlin et coll., 1997a ; Etchamendy et coll., 2001), et dans le cerveau de rats (Enderlin et coll., 1997b).

Concernant des gènes cibles de l'acide rétinoïque et de la triiodothyronine, il a été montré, au laboratoire, une baisse d'activité de la transglutaminase tissulaire dans le foie de rats (Pallet et coll., 1997) et dans le cerveau de souris (Enderlin et coll., 1997a), ainsi qu'une diminution de l'expression de la neurogranine (ARNm et protéine) dans le cerveau de souris âgées (Enderlin et coll., 1997a), et plus particulièrement dans l'hippocampe et le cortex cérébral (Mons et coll., 2001). Une étude récente a également mis en évidence une diminution de l'expression de GAP-43 dans l'hippocampe de rats âgés (Casoli et coll., 2001).

Par ailleurs, des travaux menés en collaboration avec le laboratoire de Neurosciences Cognitives (CNRS UMR 5807), ont montré que l'administration d'acide rétinoïque à des souris âgées supprimait totalement et sélectivement des déficits mnésiques (Etchamendy et coll., 2001). Ces données constituent la première démonstration d'une relation entre le niveau d'activité de la voie de signalisation de l'AR et des performances cognitives. Enfin, des études épidémiologiques ont mis en évidence la concomitance pouvant exister entre des dysfonctionnements thyroïdiens et certaines pathologies cognitives (Tremont et coll., 2003). Ces différentes données confortent l'hypothèse qui suggère qu'un hypofonctionnement des voies de signalisation des rétinoïdes et des hormones thyroïdiennes a des répercussions sur la plasticité cérébrale, et contribue ainsi au déclin des capacités mnésiques du sujet âgé.

## **C. RETINOÏDES, HORMONES THYROÏDIENNES ET ALCOOL**

Les effets négatifs d'une consommation excessive d'alcool sur la santé sont bien décrits et ne font plus l'objet de controverses. Par contre, les effets résultants de consommations modérées sont moins connus et restent discutés. Il est toutefois admis qu'une consommation modérée d'alcool pourrait avoir des effets positifs sur les risques de maladies cardiovasculaires mais également sur l'apparition de troubles mnésiques (Expertise collective-INSERM, 2001).

Après quelques rappels généraux concernant l'alcool et ses actions sur le cerveau, nous allons détailler les interférences de l'éthanol dans les métabolismes de l'acide rétinolique et des hormones thyroïdiennes.

### **I. Alcool : absorption, distribution tissulaire et métabolisme**

L'éthanol est une petite molécule absorbée par simple diffusion. Cette diffusion est lente au niveau gastrique et la majeure partie est absorbée au niveau de l'intestin grêle. Sa distribution dans l'organisme est très rapide notamment vers les organes très vascularisés comme le cerveau, les poumons et le foie. Deux voies contribuent à l'élimination de l'éthanol : l'excrétion sous forme inchangée (sueur, urines, air expiré), et le métabolisme. L'essentiel du métabolisme de l'éthanol a lieu dans le foie (80% de l'alcool ingéré y est éliminé) (**figure 8**). Il fait intervenir deux oxydations successives : l'éthanol est d'abord transformé en acétaldéhyde puis en acétate. La première oxydation, réversible, fait intervenir trois voies enzymatiques : (i) la voie de l'alcool-déshydrogénase (ADH) qui est la voie prépondérante, (ii) la voie microsomale qui implique le système MEOS (système microsomal d'oxydation de l'éthanol) et plus particulièrement une isoenzyme du cytochrome P450 (le CYP2E1). Cette voie microsomale est inductible par l'éthanol dans le cas de consommation chronique (Lieber et Abittan, 1999). (iii) Une autre voie, celle de la catalase, est sollicitée en cas d'une forte prise d'alcool (Agarwal, 2001). La deuxième oxydation est réalisée par des aldéhydes déshydrogénases (Expertise collective-INSERM, 2001). Toutes ces enzymes du

métabolisme de l'éthanol sont également présentes dans le cerveau (Upadhy et coll., 2000 ; Correa et coll., 2001 ; Galter et coll., 2003).

## **II. Alcool et cerveau**

Les effets pharmacologiques de l'éthanol peuvent affecter l'organisation des membranes, le fonctionnement d'enzymes associées aux membranes, les signaux de transduction, les canaux ioniques, ..., l'expression génique (revue dans Fadda et Rossetti, 1998).

Dans le cerveau, l'éthanol peut influencer le fonctionnement de la majorité des processus neurobiologiques aux niveaux systémique, moléculaire et cellulaire. Au plan systémique, la consommation chronique d'alcool induit principalement des troubles cognitifs (Ryabinin et coll., 2002 ; revue dans Wiers et coll., 2002). Au niveau tissulaire et cellulaire, la consommation chronique d'alcool entraîne une atrophie cérébrale caractérisée par des pertes cellulaires (Jang et coll., 2002) et des modifications de la plasticité synaptique (Roberto et coll., 2003 ; revue dans Chandler et coll., 2003). Enfin, aux niveaux subcellulaires et moléculaire, l'alcool interfère dans de nombreux processus de signalisation cellulaire impliquant des neurotransmetteurs (revue dans De Witte et coll., 2003), des seconds messagers et des hormones. L'éthanol affecte notamment la fonctionnalité des récepteurs glutamatergiques NMDA (revue dans Allgaier, 2002), et des récepteurs du GABA (revue dans Golovko et coll., 2002).

Dans la suite de cette étude bibliographique nous allons faire le point sur les répercussions de la consommation d'alcool sur les statuts vitaminique A et thyroïdien.

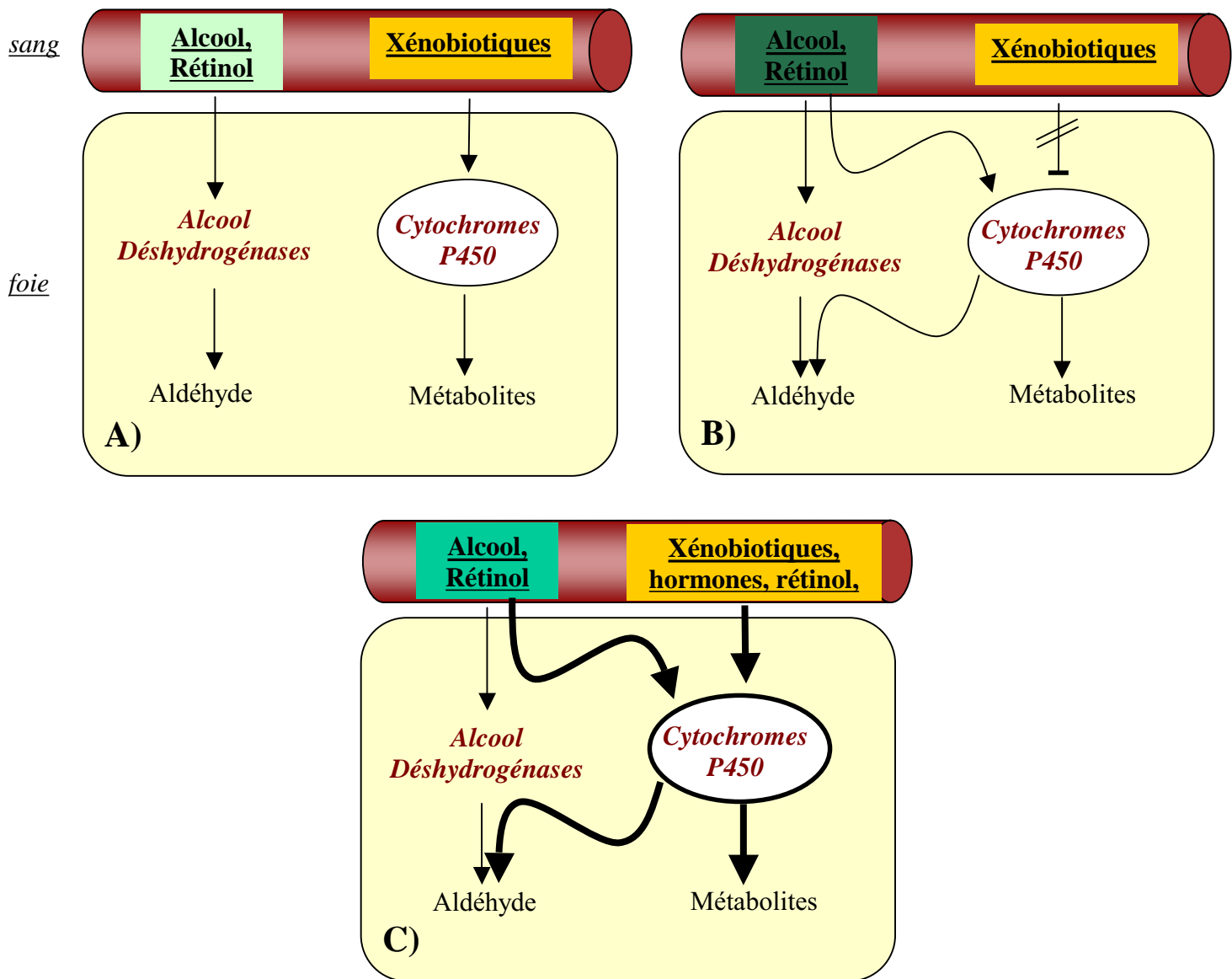
### **III. Alcool et statuts vitaminique A et thyroïdien**

#### **III.1. Alcool et statut vitaminique A**

Il existe de nombreuses interférences entre le métabolisme de l'éthanol et celui des rétinoïdes (**figure 8**). Les effets de la consommation chronique d'alcool sur le statut vitaminique A ont d'abord été étudiés au niveau du foie, organe principal de stockage et de métabolisation de la vitamine A. La consommation chronique d'alcool entraîne une sévère déplétion de la vitamine A hépatique chez le rat et chez l'homme (revue dans Leo et Lieber, 1999). Cette diminution n'est pas due à une carence alimentaire puisqu'elle persiste lorsqu'on soumet le sujet à un régime surchargé en vitamine A (Sato et Lieber, 1981). Par ailleurs, Grummer et Erdman (1983) ont montré, chez le rat, que la consommation d'alcool ne modifie pas l'absorption intestinale du  $\beta$ -carotène, ni celle du rétinyl acétate. Il est aujourd'hui admis que deux phénomènes peuvent être responsables de la déplétion hépatique en vitamine A. Elle peut résulter soit d'une mobilisation du rétinol du foie vers d'autres organes, soit d'une augmentation de sa métabolisation (revue dans Leo et Lieber, 1999).

L'hypothèse concernant la mobilisation de la vitamine A hépatique vers d'autres organes est étayée par plusieurs données de la littérature. Ainsi Leo et coll., (1986) ont montré une augmentation de la vitamine A dans l'œsophage, les reins et les testicules chez le rat soumis à une consommation chronique d'alcool. Frank et coll. (1976) ont mis en évidence, après administration d'une dose aiguë d'alcool (9 g/kg) chez le rat, une diminution de la vitamine A dans le foie et une forte augmentation dans le cerveau. Ces données sont par ailleurs confortées par des résultats montrant une augmentation de la vitamine A sérique et de sa protéine de transport plasmatique (RBP), sous l'effet de l'alcool (Sato et Lieber, 1982 ; Bjerneboe et coll., 1986 ; Guillard et coll., 1994).

La deuxième hypothèse est confortée par un ensemble de résultats qui précise le mode d'intervention de l'alcool dans le métabolisme de la vitamine A. L'éthanol et le rétinol possèdent des similarités au point de vue chimique (fonction alcool) et peuvent être oxydés en aldéhydes (acétaldéhyde et rétinol) puis en acides carboxyliques (acides acétique et rétinoïque), ces oxydations impliquant parfois des enzymes communes (ADH, ALDH)(revue dans Crabb et coll., 2001). Ainsi, la présence d'éthanol aurait la capacité d'inhiber le



**Figure 8 : Métabolisme hépatique de l'éthanol, dans différentes conditions d'alcoolisation** (D'après Lieber, 1997)

**A)** En présence de faibles concentrations d'alcool, le métabolisme hépatique de l'éthanol fait intervenir de manière prépondérante la voie de l'alcool déshydrogénase (ADH). **B)** En présence de doses aiguës d'alcool, le métabolisme de l'éthanol fait intervenir à la fois la voie de l'ADH et la voie microsomale (cytochromes P450). Il y a alors compétition de substrats entre l'éthanol et d'autres xénobiotiques au niveau des cytochromes P450, conduisant à une fragilité hépatique des sujets alcooliques. De plus, dans ce cas, l'éthanol par compétition de substrats au niveau des ADH peut inhiber le métabolisme du rétinol. **C)** La consommation chronique d'alcool induit les cytochromes P450 et augmente fortement leur activité enzymatique. Dans ces conditions, cette voie microsomale devient prépondérante dans le métabolisme de l'éthanol et intervient également dans le métabolisme d'autres molécules endogènes, telles que le rétinol.

métabolisme du rétinol par compétition de substrat au niveau de l'ADH. Par ailleurs, *in vivo*, la consommation chronique d'alcool induit une augmentation de l'activité de la rétinol déshydrogénase hépatique chez le rat (Leo et coll., 1989). Et, plus récemment, Boerman et Napoli (1996) ont mis en évidence, *in vitro*, une augmentation de l'activité des rétinol-déshydrogénases microsomales par l'éthanol.

La consommation chronique d'alcool induit de nombreux cytochromes dont certains peuvent métaboliser l'AR. C'est le cas principalement des cytochromes P450 2E1 (revue dans Kessova et Cederbaum, 2003), mais aussi P450 2B1 (revue dans Schoedel et coll., 2001), qui sont impliqués dans le catabolisme de l'AR en métabolites polaires (18-hydroxy et 4-oxo acide rétinoïque) (Liu et coll., 2001). Par ailleurs, l'induction de certains cytochromes P450 par la consommation chronique d'alcool peut avoir pour conséquence une augmentation de la synthèse d'acide rétinoïque. C'est le cas notamment du cytochrome P450 1A1 (Zhang et coll., 2000) qui est impliqué dans les voies de synthèse de l'acide rétinoïque à partir du rétinol (Raner et coll., 1996). L'alcool induit également certains cytochromes P450 dans le cerveau (Warner et Gustafsson, 1994). Une étude réalisée chez des rats soumis à une administration aiguë d'alcool a mis en évidence des modifications différentes de la concentration cellulaire d'AR selon les structures cérébrales : augmentation dans le cervelet et diminution dans le cortex (Ullman et coll., 1998). Ces différentes données suggèrent des effets différents de l'alcool sur le métabolisme des rétinoïdes selon les conditions d'alcoolisation et les organes étudiés.

L'intervention de l'alcool dans le métabolisme de la vitamine A a été aussi étudiée au cours de l'embryogenèse. Par contre, les résultats obtenus dans cette situation plaident en faveur d'une baisse de la synthèse d'acide rétinoïque. En effet, l'éthanol inhibe l'activité des alcool-déshydrogénases de classe I et IV qui peuvent aussi oxyder le rétinol en rétinol (Mezey et Holt, 1971 ; Allali-Hassani et coll., 1998). Depuis plusieurs années, Duester a émis l'hypothèse que l'inhibition des ADH par l'éthanol entraînait une diminution de la synthèse d'acide rétinoïque et, par voie de conséquence, le déficit en acide rétinoïque pouvait contribuer aux malformations observées dans le syndrome d'alcoolisme fœtal (revue dans Duester 1995 et 1998). Cette hypothèse a été confortée par les résultats de Deltour et coll. (1996) qui ont montré une inhibition de la synthèse d'acide rétinoïque chez des embryons de souris traités par l'éthanol.

Les différentes données rapportées ci-dessus montrent que l'éthanol interfère fortement dans le métabolisme de la vitamine A et les voies de synthèse de l'acide rétinolique. Les conséquences potentielles de ce phénomène peuvent être importantes compte tenu des rôles essentiels que joue l'acide rétinolique, dans la régulation de l'expression génique aussi bien chez l'embryon que chez l'adulte.

### **III.2. Alcool et statut thyroïdien**

La consommation d'alcool a également des répercussions sur l'axe hypothalamo-hypophysaire mais la nature de ces effets reste controversée (revue dans Hermann et coll., 2002). La majorité des études a mis en évidence des taux normaux de T4 totale (liée ou libre) chez des sujets consommant de l'alcool. Par contre, différentes études menées chez des sujets alcooliques ont montré des taux sériques de T3 liée ou libre normaux ou diminués (Baumgartner et coll., 1994 ; Heinz et coll., 1996). La majorité des résultats font apparaître que la TSH ne varie pas malgré une diminution de la T<sub>3</sub> ou T<sub>4</sub> libre (revue dans Hermann et coll., 2002). Ceci tendrait à montrer que les patients alcooliques ne sont probablement pas dans un état classique d'hypothyroïdie, état qui induit généralement une augmentation de la TSH sérique. Des précisions ont été apportées par une étude biomédicale récente qui, tenant compte du rythme circadien de production de la TSH, montre une diminution du pic nocturne de synthèse de la TSH, sans modification de sa production dans la journée (Danel et Touitou, 2003). Par ailleurs, un ensemble de résultats cohérents montrent que l'alcoolisation induit une diminution de la production de TSH suite à une stimulation de la TRH (revue dans Hermann et coll., 2002). La consommation chronique d'alcool peut aussi provoquer une atrophie de la glande thyroïde caractérisée par une diminution de son volume et une augmentation de la fibrose (Hegedus et coll., 1988 ; Knudsen et coll., 2001).

D'autres résultats peuvent nous aider à mieux comprendre les effets complexes de l'alcool sur le métabolisme des hormones thyroïdiennes. Ainsi, Israel et coll. (1973 et 1975) ont décrit depuis longtemps le développement d'un état d'hypermétabolisation caractérisé par une augmentation du métabolisme respiratoire dans le foie de rats soumis à une alcoolisation chronique. De plus, ces auteurs avaient aussi montré que l'administration d'alcool entraînait une augmentation de la capture cellulaire de T<sub>4</sub> et que l'état d'hypermétabolisme hépatique



pouvait être mimé par l'administration de T<sub>4</sub> (Israel et coll., 1973). Chez l'homme, il a aussi été mis en évidence, chez des sujets alcooliques récemment sevrés, une augmentation du transfert de la T<sub>4</sub> du plasma vers les tissus (Kaptein, 1997). Ces modifications du transfert des hormones thyroïdiennes plasmatiques vers les tissus pourraient en partie expliquer la diminution de leur taux plasmatique et que la consommation chronique d'alcool puisse induire un état "d'hyperthyroïdie fonctionnelle". Cette hypothèse a été confortée par une étude qui a montré qu'un antithyroïdien, le propyl thiouracil (PTU), supprime l'état d'hypermétabolisation hépatique chez le rat alcoolisé (Carmichael et coll., 1993) et a un effet bénéfique chez des patients alcooliques présentant une pathologie hépatique (Orrego et coll., 1987 et 1994).

Par ailleurs, l'équipe de Baumgartner a étudié l'intervention de l'éthanol dans le métabolisme des hormones thyroïdiennes (Baumgartner et coll., 1994 ; Baumgartner et coll., 1997). Les résultats de ces auteurs montrent une induction de l'activité de la 5'-déiodinase de type II (cette enzyme métabolise la T<sub>3</sub> en T<sub>4</sub>) dans le cerveau de rats alcoolisés, notamment dans le cortex frontal (Baumgartner et coll., 1997 ; Baumgartner et coll., 1998 ; Eravci et coll., 2000).

#### **IV. Alcool et action nucléaire des rétinoïdes et des hormones thyroïdiennes**

Les données présentées ci-dessus montrent que l'éthanol interfère dans le métabolisme du rétinol et des hormones thyroïdiennes. C'est pourquoi une consommation chronique d'alcool conduit à des modifications dans les statuts vitaminique A et thyroïdien. Quelles sont les répercussions de ces phénomènes sur l'action nucléaire de ces hormones ?

Plusieurs études ont déjà été réalisées au laboratoire pour répondre à cette question. Des souris adultes de la lignée C57Bl/6 ont été soumises à une consommation chronique d'alcool (éthanol 12% dans l'eau de boisson) durant 6 et 10 mois. Les conséquences de ces traitements sur l'expression des récepteurs nucléaires de l'AR (RAR) et de la T<sub>3</sub> (TR) ont été mesurées dans le foie des animaux. Nos résultats montrent, après 6 mois de consommation

d'alcool, une augmentation de l'expression des ARNm des TR, et après 10 mois de consommation l'augmentation concerne aussi les RAR (Pallet et coll., 1993).

Ces résultats nous ont incité à étendre nos analyses au cerveau, c'est pourquoi ce travail de thèse est consacré aux effets de l'alcool sur l'action cellulaire de l'AR et de la T3 dans le cerveau. Il est aujourd'hui admis qu'une partie des troubles neurologiques observés chez des animaux exposés avant la naissance à l'alcool, serait attribuable à une interférence entre l'éthanol et les voies d'action des hormones thyroïdiennes et des rétinoïdes. Scott et coll. ont (1998) éprouvé cette hypothèse sur des embryons de rats soumis *in utero* à une exposition chronique d'alcool. Leurs résultats montrent un effet spécifique sur l'expression des ARNm des récepteurs de la T3, selon les structures cérébrales étudiées, et les isoformes de TR. Ainsi, l'exposition prénatale à l'éthanol induit une diminution de l'ARNm de TR $\alpha$ 1, dans le cortex cérébral et l'hippocampe.

L'équipe de Grummer et Zachman a étudié les conséquences de la consommation d'alcool sur l'action des rétinoïdes dans le cerveau d'embryons. Leurs résultats montrent une augmentation de l'expression des ARNm de CRBP et une diminution des ARNm de RAR $\beta$ , sans modification du niveau d'expression des ARNm de RAR $\alpha$  ni RAR $\gamma$  (Grummer et Zachman, 1995). *In vitro*, sur des cellules embryonnaires astrocytaires, ces mêmes auteurs ont aussi mis en évidence une diminution de l'expression de RAR $\beta$ , en présence d'une dose aiguë d'alcool (Grummer et coll., 2000).

Dans le cerveau d'animaux adultes soumis à une alcoolisation chronique, les effets sur l'expression des récepteurs nucléaires de l'AR et de la T3 sont différents. En effet, des études réalisées au laboratoire chez des souris adultes de la lignée C57Bl/6 soumises à une consommation chronique d'alcool (éthanol 12% dans l'eau de boisson pendant 6 et 10 mois) ont mis en évidence une augmentation de l'expression des ARNm des récepteurs TR $\alpha/\beta$  et RAR $\beta$  ainsi que de l'activité de la transglutaminase tissulaire (gène cible de l'AR)(Alfos et coll., 1996).

En résumé, les données bibliographiques font apparaître que selon l'âge des sujets et la condition d'alcoolisation les conséquences sur l'activité des voies de signalisation de l'AR et de la T3 pourraient être différentes. Dans ce contexte, nous avons émis une hypothèse qui

relie l'intervention de l'alcool dans le métabolisme de l'AR et de la T3 et ses conséquences neurobiologiques. Cette hypothèse a été éprouvée et précisée dans ce travail de thèse.



**OBJECTIFS DE LA THESE**



## **OBJECTIFS DE LA THESE**

Les données bibliographiques présentées ci-dessus suggèrent que les rétinoïdes et les hormones thyroïdiennes qui jouent des rôles essentiels dans le développement du système nerveux central sont aussi impliquées dans la plasticité du cerveau adulte. C'est la raison pour laquelle certains auteurs évoquent l'idée selon laquelle des dérégulations, même faibles, des niveaux d'expression des récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque ou de la triiodothyronine pourraient se trouver à l'origine de bien des maladies du système nerveux comme de son vieillissement (Goodman et Pardee, 2003). C'est pourquoi il est aujourd'hui envisagé que certaines atteintes de la mémoire peuvent appartenir à une catégorie de modifications fonctionnelles générées par des altérations de l'expression de récepteurs nucléaires et susceptibles d'être compensées par l'administration d'un «traitement» efficace.

Notre hypothèse de travail s'inscrit dans ce contexte. Elle prend en compte nos premiers résultats expérimentaux qui ont montré qu'une consommation chronique d'alcool s'accompagne d'une augmentation de l'expression des récepteurs nucléaires de l'AR et de la T3 (Pallet et coll., 1993 ; Alfos et coll., 1996) et suggère que ce phénomène entraîne des répercussions sur les processus neurobiologiques et cognitifs.

Cette hypothèse a été éprouvée par une approche expérimentale réalisée chez des animaux adultes et âgés soumis à différentes conditions d'alcoolisation chroniques.

La première partie de ce travail expérimental, réalisée chez la souris adulte, avait pour objectif de mieux comprendre les conséquences d'une consommation d'alcool sur l'expression des récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque et les capacités mnésiques de l'animal. Les résultats ont démontré la place prépondérante prise par la surexpression des récepteurs RAR $\beta$  dans l'apparition de troubles mnésiques et ont fait l'objet d'une première publication (Chapitre II).

Publication1

***A retinoic acid receptor antagonist suppresses brain retinoic acid receptor overexpression and reverses a working memory deficit induced by chronic ethanol consumption in mice.***

Alfos et coll., 2001

Alcoholism: Clinical and Experimental Research, 25(10), pp 1506-1514

Compte tenu de ces premiers résultats, nous avons cherché par la suite à savoir si une consommation modérée d'alcool est susceptible d'activer, chez l'animal âgé, les voies de signalisation de l'acide rétinoïque et de la triiodothyronine (hormone qui agit en synergie) et par voie de conséquence d'atténuer certains déficits mnésiques liés au vieillissement. Les résultats de ces travaux font l'objet des deux publications suivantes (Chapitre III et IV).

Publication2

***Ethanol consumption reverses the age-related hypo-expression of triiodothyronine and retinoic acid nuclear receptors and associated target genes coding for neurogranin and neuromodulin, in mouse brain.***

Boucheron et coll., 2004

soumise à Mechanism of Ageing and Development

Publication3

***Moderate ethanol consumption suppresses an age-related relational memory deficit in mice: involvement of retinoid and triiodothyronine signalling pathways.***

Boucheron et coll., 2004 (en préparation)



Enfin, conformément aux orientations générales du laboratoire, nous avons cherché à éprouver nos hypothèses chez l'homme. Ce travail a été réalisé chez des sujets âgés recrutés dans une cohorte épidémiologique dite des 3 Cités. Nous avons d'abord cherché à déterminer si la consommation d'alcool s'accompagnait d'une modification de l'activité des voies de signalisation de l'AR et de la T3. Dans ce but, nous avons mesuré les niveaux d'expression des récepteurs nucléaires de l'AR et de la T3 dans les cellules mononucléées du sang des sujets. Les résultats de cette étude font l'objet d'une publication (Chapitre V).

Publication 4

*Relationship between long-term alcohol consumption and retinoic acid and triiodothyronine nuclear receptor expression in mononuclear cells of healthy human subjects.*

Boucheron et coll., 2004

Soumise à American Journal of Clinical Nutrition



## **CHAPITRE II**

# **EFFETS D'UNE CONSOMMATION CHRONIQUE D'ALCOOL SUR L'ACTION CELLULAIRE DE L'ACIDE RETINOÏQUE ET LA MEMOIRE DE TRAVAIL CHEZ LA SOURIS ADULTE**



## **Chapitre II**

### **EFFETS D'UNE CONSOMMATION CHRONIQUE D'ALCOOL SUR L'ACTION CELLULAIRE DE L'ACIDE RÉTINOÏQUE ET LA MÉMOIRE DE TRAVAIL CHEZ LA SOURIS ADULTE**

De nombreux arguments expérimentaux suggèrent que l'éthanol interfère dans le métabolisme de la vitamine A (revue dans Leo et Lieber, 1999). Il a notamment été montré que la consommation chronique d'alcool augmente l'activité d'enzymes impliquées dans le métabolisme du rétinol. Ce phénomène concerne des rétinol déshydrogénases microsomiales (Boerman et Napoli, 1996), des rétinol déshydrogénases hépatiques (Leo et coll., 1989) et plusieurs cytochromes P450 (Zhang et coll., 2000). L'alcool pourrait ainsi modifier le niveau intracellulaire d'acide rétinoïque et, par voie de conséquence, affecter l'expression de ses récepteurs nucléaires dont on sait qu'ils sont autorégulés par leur ligand. Cette hypothèse a été précédemment éprouvée au laboratoire chez des souris adultes de la lignée C57Bl/6 soumises à une consommation chronique d'alcool (éthanol 12% dans l'eau de boisson), pendant 6 et 10 mois. Dans ces conditions expérimentales, nous avons mis en évidence une augmentation de l'expression des récepteurs nucléaires de l'AR dans le foie (Pallet et coll., 1993) et le cerveau (Alfos et coll., 1996) des souris alcoolisées par rapport aux animaux témoins.

Par ailleurs, des études comportementales effectuées sur des souris BALB/c soumises à un protocole d'alcoolisation similaire à celui mis en œuvre dans nos expériences ont mis en évidence l'apparition de troubles de la mémoire spatiale sur un test d'alternance spontanée (Béracochéa et coll., 1987).

Des données récentes ont révélé les rôles essentiels que joue l'acide rétinoïque dans le fonctionnement du cerveau adulte (revue dans Malik et coll., 2000) et les conséquences de modifications de l'activité de sa voie de signalisation sur l'apparition de troubles cognitifs (Chiang et coll., 1998 ; Etchamendy et coll., 2001).

*Dans ce contexte, l'objectif de la première partie de ce travail de thèse était d'éprouver une hypothèse qui impliquait la surexpression des récepteurs de l'acide rétinoïque dans la genèse de certains troubles neurobiologiques et mnésiques observés chez des animaux alcoolisés.*

C'est pourquoi, nous avons étudié d'une part, l'activité de la voie de signalisation des rétinoïdes en mesurant l'expression des récepteurs nucléaires ( $RAR\alpha$ ,  $RAR\beta$  et  $RXR\beta/\gamma$ ) et la réponse d'un de leurs gènes cibles (la transglutaminase tissulaire), dans le cerveau de souris adultes soumises à une consommation chronique d'alcool, en présence ou non d'un antagoniste spécifique du récepteur  $RAR\beta$  (CD2665). D'autre part, nous avons évalué les effets de ces traitements sur la mémoire spatiale des animaux alcoolisés.

Les résultats de ces études ont fait l'objet de la publication 1.

## **Méthodologie utilisée**

### **Antagoniste utilisé**

Nous avons choisi d'utiliser un antagoniste spécifique du récepteur  $RAR\beta$ , qui constitue le type de RAR le plus exprimé dans le cerveau adulte (Yamagata et coll., 1993 ; Zetterström et coll., 1999) et qui semble être le mieux régulé par son ligand, que ce soit en surcharge ou en carence vitaminique A (de Thé et coll., 1989 ; Kato et coll., 1992). Par ailleurs, les études précédemment menées au laboratoire avaient mis en évidence une surexpression du  $RAR\beta$  dans le cerveau de souris soumises à nos conditions d'alcoolisation (Alfos et coll., 1996). Cet antagoniste spécifique, référencé CD2665, nous a été aimablement fourni par le Dr U. Reichert du Centre International de Recherches Dermatologiques (Galderma/CIRD Sophia Antipolis).

### **Protocole expérimental**

Nous avons utilisé des souris mâles âgées de 2 mois de la lignée C57Bl/6, réparties en trois groupes : un groupe témoin «eau», un groupe témoin «apparié» et un groupe «alcool». Après 10 mois d'alcoolisation, nous avons divisé les groupes de départ, pour avoir finalement : un groupe «eau», un groupe «apparié», un groupe «alcool», un groupe «alcool + CD2665» et un groupe «eau + CD2665». Chaque groupe a alors reçu, pendant 2 semaines, une administration sous-cutanée quotidienne de l'antagoniste du RAR $\beta$  (CD2665) à la dose de 0,6 mg/kg ou d'une solution placebo.

Chez tous les animaux, nous avons évalué le niveau d'activité de la voie de l'AR, en mesurant l'expression des récepteurs nucléaires RAR $\alpha$  et  $\beta$  et RXR $\beta/\gamma$  mais également l'expression et l'activité de la tTG dans le cerveau. Cette enzyme est considérée comme un bon marqueur de l'action *in vivo* des rétinoïdes ; elle reflète directement le niveau d'expression des RAR présents au niveau nucléaire (Verma et coll., 1992).

Nous avons également évalué la mémoire spatiale des animaux en utilisant un test d'alternance spontanée. L'alternance spontanée est la tendance innée de la plupart des rongeurs à alterner leur choix d'entrée dans les compartiments d'arrivée d'un labyrinthe en T au cours d'essais successifs. Ce test met en jeu la mémoire de travail qui est altérée chez l'animal après une alcoolisation chronique (Béracochéa et coll., 1987).

### **Principaux résultats**

Nous n'avons observé aucune différence significative tant au niveau de l'expression des récepteurs nucléaires qu'au niveau des capacités mnésiques, entre les groupes témoin «eau» et témoin «apparié». C'est pourquoi, lors de la présentation des résultats ces deux groupes ont été réunis en un seul groupe Témoin.

### *Etude comportementale*

Avant le traitement par l'antagoniste des récepteurs RAR $\beta$ , nous observons un déficit marqué d'alternance spontanée chez les animaux alcoolisés depuis 10 mois. En revanche, les animaux alcoolisés traités par le CD2665, ne présentent plus la surexpression des RAR $\beta$  dans le cerveau et leurs performances dans le labyrinthe en T deviennent comparables à celles des animaux témoins.

Dans nos conditions de test, les animaux témoins soumis au traitement par l'antagoniste spécifique des RAR $\beta$  ne présentent aucune altération de leur mémoire de travail.

### *Etude biochimique*

Les animaux soumis à une consommation chronique d'alcool pendant 10 mois présentent une augmentation significative des niveaux d'expression des ARNm des récepteurs RAR $\beta$  et RXR $\beta/\gamma$  dans le cerveau par rapport au groupe Témoin. Ces résultats sont en accord avec ceux préalablement obtenus au laboratoire (Alfos et coll., 1996). En revanche, ce type d'alcoolisation n'induit pas de variation du niveau d'expression des ARNm du RAR $\alpha$ . L'administration de l'antagoniste CD2665 aux souris témoins entraîne une diminution spécifique des ARNm du RAR $\beta$ , sans affecter significativement les taux des ARNm des RAR $\alpha$  et RXR $\beta/\gamma$  dans le cerveau. Par ailleurs, l'administration de cet antagoniste supprime totalement la surexpression des ARNm des RAR $\beta$  et RXR $\beta/\gamma$  dans le cerveau des souris alcoolisées.

De plus, les souris alcoolisées présentent une augmentation significative du niveau d'expression des ARNm de la tTG et de l'activité de cette enzyme, par rapport aux témoins. Ces résultats sont en accord avec les résultats antérieurs (Alfos et coll., 1996). L'administration du CD2665 aux souris témoins n'induit pas de variation d'expression de la tTG. Par contre, l'administration de cet antagoniste aux souris alcoolisées ramène le niveau d'expression des ARNm et de l'activité enzymatique de la tTG à un niveau comparable à celui des témoins.



**PUBLICATION 1**

**A RETINOIC ACID RECEPTOR ANTAGONIST SUPPRESSES BRAIN RETINOIC ACID  
RECEPTOR OVEREXPRESSION AND REVERSES A WORKING MEMORY DEFICIT  
INDUCED BY CHRONIC ETHANOL CONSUMPTION IN MICE**



# A Retinoic Acid Receptor Antagonist Suppresses Brain Retinoic Acid Receptor Overexpression and Reverses a Working Memory Deficit Induced by Chronic Ethanol Consumption in Mice

Serge Alfos, Catherine Boucheron, Véronique Pallet, Denise Higuieret, Valérie Enderlin, Daniel Béracochéa, Robert Jaffard, and Paul Higuieret

**Background:** Chronic ethanol consumption induces disorders in the biosynthesis of retinoic acid, an active derivative of vitamin A. Recent evidence suggests that an alteration in the retinoic acid signaling pathway leads to impairments in learning and memory in adult mice. We have previously shown that chronic ethanol consumption in mice produces an increased expression of the brain retinoic acid receptor  $\beta$  (RAR $\beta$ ) mRNA. These results prompted us to examine whether suppressing the overexpression of retinoid receptors in alcohol-treated mice by RAR antagonist administration would reverse their cognitive impairment.

**Methods:** After 10 months of ethanol consumption (12% v/v in drinking water), C57BL/6 mice were submitted to a working memory task in a T-maze. Then, mice of the control and the ethanol-treated groups received an RAR $\beta$  antagonist (CD2665 0.6 mg/kg) for 22 days. The behavioral effect of CD2665 administration was evaluated on a spontaneous alternation task and the neurochemical effect was measured by quantifying the mRNA expression of RAR $\alpha$ , RAR $\beta$ , retinoid X receptor (RXR $\beta/\gamma$ ) and tissue transglutaminase (tTG; a retinoic acid-target gene).

**Results:** Mice submitted to ethanol treatment exhibited a progressive decrease in spontaneous alternation rates over successive trials. Moreover, these mice displayed an increased expression of brain RAR $\beta$  and RXR $\beta/\gamma$  mRNA, together with an increased level of tTG mRNA and enzymatic activity. The administration of CD2665 to alcohol-treated mice totally reversed the working memory deficit and suppressed the overexpression of brain RAR $\beta$ , RXR $\beta/\gamma$  and tTG mRNA, whereas the same treatment in control mice decreased only the RAR $\beta$  mRNA level without affecting memory performance.

**Conclusion:** These data point to the potential role of the retinoid signaling pathway in memory processes and suggest that the overexpression of brain RAR $\beta$  and RXR $\beta/\gamma$  could be responsible, at least in part, for some memory impairments observed during chronic ethanol consumption.

**Key Words:** Retinoic Acid, Retinoic Acid Receptor Antagonist, Tissue Transglutaminase, Chronic Ethanol Consumption, C57BL/6 Mouse Brain.

**C**HRONIC ETHANOL CONSUMPTION in humans and animals has been found to result in brain damage that is often associated with learning and recent memory impairments (Fadda and Rossetti, 1998; Oscar-Berman et al., 1997). Long-term ethanol abuse is also known to impair

the nutritional status of numerous vitamins, including that of vitamin A (retinol) (Seitz and Suter, 1994). Indeed, various animal experiments have clearly shown that chronic ethanol administration results in a depression of hepatic vitamin A that cannot be attributed to insufficient vitamin A intake or malabsorption (Sato and Lieber, 1981). Several mechanisms by which ethanol might interfere with vitamin A metabolism have been proposed, especially a mobilization of retinol from liver to other organs, including the brain (Frank et al., 1976; Leo et al., 1986), and also an induction of enzymes involved in the biosynthesis pathway of retinoic acid (Boerman and Napoli, 1996; Leo et al., 1989). Retinoic acid, the most physiologically active derivative of vitamin A, acts as a hormone and fulfills vitamin A roles during embryonic development and physiologic processes in a number of adult organs (Sporn et al., 1994). Recent studies have demonstrated that the effect of chronic

*From the Unité de Nutrition et Signalisation Cellulaire (SA, CB, VP, VE, PH), Institut des Sciences et Techniques des Aliments de Bordeaux, Université Bordeaux I, Talence, France; Laboratoire de Biochimie (DH), Hôpital Pellegrin, Bordeaux, France; and Laboratoire de Neurosciences Cognitives (DB, RJ), Centre National de la Recherche Scientifique Unité Mixte de Recherche 5106, Université Bordeaux I, 33405 Talence, France.*

*Received for publication December 6, 1999; accepted July 30, 2001.*

*Supported by a grant from the Institut de Recherches Scientifiques sur les Boissons (IREB, Paris) and the Conseil Régional d'Aquitaine.*

*Reprint requests: P. Higuieret, Unité de Nutrition et Signalisation Cellulaire, ISTAB, Université Bordeaux I, 33405 Talence Cedex, France; Fax: 33-5-56-84-27-76; E-mail: p.higuieret@istab.u-bordeaux.fr.*

*Copyright © 2001 by the Research Society on Alcoholism.*

alcohol intake on the retinoic acid biosynthesis pathway may lead to an alteration of retinoic acid concentrations in several organs, including the brain (Ullman et al., 1998; Wang, 1999).

The retinoic acid signal is mediated by two classes of nuclear receptors: the retinoic acid receptors (RAR $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$ ), which are able to bind all-*trans* and 9-*cis* stereoisomers of retinoic acid; and the retinoid X receptors (RXR $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$ ), which specifically bind 9-*cis* retinoic acid (Chambon, 1996; Mangelsdorf et al., 1995). These receptors belong to the steroid/thyroid hormone nuclear receptor superfamily and function as transcription factors by binding to retinoid response elements in the promoter of target genes, predominantly in the form of RAR/RXR heterodimers (Kastner et al., 1997; Mangelsdorf and Evans, 1995).

Although retinoid signaling is known to play an important role during the normal development of the central nervous system [see the review in Ross et al. (2000)], recent evidence suggests that retinoids may play an important role in the adult central nervous system. Indeed, it has been shown that (1) the adult brain synthesizes retinoic acid and contains much of the biochemical apparatus associated with retinoic acid responsiveness and metabolism (Connor and Sidell, 1997; Dev et al., 1993; McCaffery and Dräger, 1994); and (2) cellular retinoic acid and retinol binding proteins are present in the adult brain (Zetterström et al., 1999), and localized high levels of nuclear RAR have been observed in different regions of the adult mouse central nervous system (Krezel et al., 1999). Among the RARs, RAR $\beta$  is the main isoform expressed in the mature brain and is up-regulated by retinoic acid (Yamagata et al., 1993). RXR $\beta$  and RXR $\gamma$  are also expressed at high levels in the adult brain (Krezel et al., 1999; Mangelsdorf et al., 1992). Therefore, the high expression of RAR $\beta$  and RXR $\beta/\gamma$  in the brain suggests that these receptors may contribute to specific functions in the central nervous system. This hypothesis was supported by a study showing that RAR $\beta$ /RXR $\gamma$  knockout mice exhibit substantial performance deficits in spatial learning and memory tasks (Chiang et al., 1998). More recently, we have shown that the retinoid signaling pathway plays a fundamental role in adult mouse brain. Indeed, retinoic acid administration restores the expression level of RAR $\beta$  and RXR $\beta/\gamma$ , which is depressed in aged animals, and completely alleviates a specific age-related memory deficit (Etchamendy et al., 2001).

We have previously shown that chronic ethanol consumption in C57Bl/6 mice induces a strong activation of the retinoid signaling pathway in the brain. This activation is characterized by increased amounts of RAR $\beta$  messenger RNA (mRNA) together with an increase in tissue transglutaminase (tTG) enzymatic activity (Alfos et al., 1996); *tTG* is a RAR target gene considered as a good indicator of retinoic acid action (Verma et al., 1992).

This study was designed to test the hypothesis that the overexpression of RARs could, at least in part, be respon-

sible for some spatial memory deficits observed in ethanol-treated mice. First, we examined the effect of 10 months of ethanol consumption in C57Bl/6 mice that exhibited an overexpression of RAR in the brain on a spatial working memory task. Secondly, as an approach to unmask the potential roles of retinoic acid signaling pathway overactivation in some memory disorders, we studied the effects of the administration of a RAR $\beta$  antagonist (CD2665) on the retinoid signaling pathway and on the spatial memory performance of alcohol-treated and control mice.

## METHODS

### *Animals*

The study was conducted in accordance with the European Communities Council Directives of 24 November 1986. Pathogen-free male mice of the C57Bl/6 strain were received at 6 weeks of age from Iffa-Credo (L'arbesle, France). Throughout the experiments, mice were maintained on an automatic 12:12-hr light/dark cycle in a temperature-controlled room ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ). The animals were housed in groups of 10 mice in collective cages.

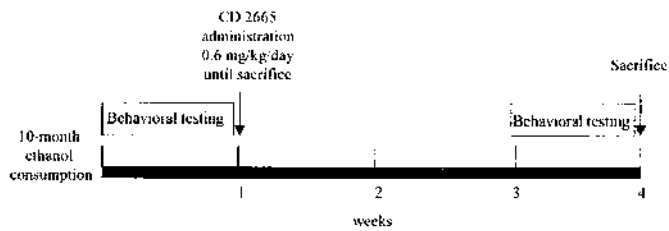
### *Alcohol Administration*

At 8 weeks of age, 55 mice were randomly assigned to one of the following experimental groups: ethanol ( $n = 20$ ), pair-fed ( $n = 10$ ), and water ( $n = 25$ ). As their only source of fluid, mice of the ethanol-treated group were given an increasing progression of ethanol over a 10-month period as follows: increments of 4% (v/v) solution per week for 3 weeks, up to a maximum concentration of 12%. The solutions were mixed from 95% ethanol and supplemented with saccharose (30 g/liter). Solutions were freely available to subjects in two 250-ml bottles in each cage. Dry food was also freely available throughout the experiment (Extra-Labo, Pietrement, France). Mice from the pair-fed group received an isocaloric solution of dextrin-maltose and an equivalent amount of dry food to that consumed by ethanol-treated animals. Mice assigned to the second control group had ad libitum access to dry food and tap water. Twice weekly, the subjects were weighed, and the quantities of food, ethanol, and dextrin-maltose solutions consumed were measured. Mice were housed in individual cages at least 4 weeks before behavioral testing began.

### *Behavioral Testing: Spontaneous Alternation*

Spontaneous alternation is the innate tendency of rodents to alternate on each trial the choice of the visited goal arm over a series of successive runs (sequential procedure) in a T maze. The sequential procedure makes it possible to distinguish between the rodent's ability to alternate per se (second trial of a series) from its progressive inability to do so as the number of trials increases. In the latter case, repetitive testing (i.e., sequences of more than two trials) constitutes a potent source of proactive interferences because the response on trial  $n$  (which depends on information received on trial  $n - 1$ ) may be influenced by all previous information received from trials 1 to  $n - 2$  (Grant, 1981). Accordingly, the task involves a working memory component, because correct choices require the subject to refer to specific information that varies from trial to trial (Béracochéa and Jaffard, 1987).

In this study, working memory testing was conducted with an automated T maze constructed of gray Plexiglas. Door opening and closing were monitored by a computer program that also recorded the sequence of arm choices, running times, and choice latencies. The sequential alternation procedure was the same as that previously described by Béracochéa et al. (1987). Briefly, 3 days before the beginning of testing for spontaneous alternation, the animals were given free exploration sessions daily of 5 min each to familiarize them with the apparatus. Then, animals were submitted to a daily session of six successive free trials, separated by a



**Fig. 1.** Experimental design of the behavioral procedure. C57Bl/6 mice were submitted to a working memory task after 10 months of 12% ethanol consumption.

30-sec intertrial interval, for eight consecutive days. An alternation response was quantified each time the subject entered the arm opposite to that visited in the previous trial. This procedure has already revealed memory deficits in BALB/c mice submitted to 12 months of alcohol consumption (Béracochéa et al., 1987, 1995).

#### Drug Administration

CD2665, a RAR $\beta$  antagonist (Szondy et al., 1997), was synthesized by Galderma/R.D. (Sophia-Antipolis, France). It was dissolved in a mixture containing polyethylene glycol/NaCl 9%*o*/ethanol (70/20/10 v/v/v). Mice were injected subcutaneously with 0.6 mg of CD2665 per kilogram body weight per day in a volume of 100  $\mu$ l. The control group received only polyethylene glycol/NaCl 9%*o*/ethanol (vehicle) administration. This percentage of ethanol corresponded to an amount of 0.24 g of alcohol per kilogram body weight in the vehicle injections. We used a dose of RAR antagonist that was previously shown to suppress RAR $\beta$  mRNA overexpression in brains of alcohol-treated mice (S. Alfós, unpublished data, 1998).

#### Experimental design

**Phase 1.** After 10 months of alcohol consumption, mice in each group were first submitted to the sequential alternation procedure (daily sessions of six successive trials for 8 days) to ensure that alcohol-treated mice displayed a spatial working memory deficit on this task (Fig. 1). To avoid any acute effects of alcohol on behavior, the ethanol solution was removed 3 hr before the beginning of the spontaneous alternation task at 10:00 AM. We measured blood alcohol levels in the same conditions at the time of death.

**Phase 2.** At the end of the 8 days of behavioral testing, mice of the control and alcohol-treated groups were randomly divided into five subgroups: water, pair-fed, alcohol, alcohol and CD2665, and water and CD2665. Each group received either the RAR $\beta$  antagonist CD2665 (0.6 mg/kg body weight) or the vehicle. Treatments were administered subcutaneously at 6:00 to 7:00 PM each day for 2 weeks. Then mice of each group were submitted to the spontaneous alternation task according to the same procedure as previously used in phase 1. Animals continued to receive treatments (CD2665 or vehicle) until completion of behavioral testing (i.e., for 8 days). Mice were killed 12 hr after the last injection, and the brain was rapidly removed and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for subsequent analysis.

#### Quantitation of Brain mRNA

Brain mRNA amounts coding for RAR $\alpha$ , RAR $\beta$ , RXR $\beta/\gamma$ , and tTG were determined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay with  $\beta$ -actin as an internal control. To minimize the variability and optimize the reliability of the ensuing quantification,  $\beta$ -actin was simultaneously reverse-transcribed and amplified in the same test tube. The constancy of the level of  $\beta$ -actin mRNA was verified in our experimental conditions by using a competitive RT-PCR method and the PCR MIMIC<sup>TM</sup> Construction Kit (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA), according to the manufacturer's protocol. Moreover, it is known that long-

term ethanol consumption in rodents does not affect brain  $\beta$ -actin mRNA levels (Putzke et al., 1998). Extraction of RNA was performed according to Chomczynski and Sacchi (1987). The integrity of the purified RNA was confirmed by formaldehyde-denaturing agarose gel electrophoresis. The quality and the concentration of RNA were determined by measurement of the ultraviolet (UV)<sub>260</sub>/UV<sub>280</sub> absorbance ratio. The complementary DNA preparation, PCR analysis, and quantitative determination of PCR products were performed as previously described by Alfós et al. (1996). Aliquots of the PCR reaction were sampled after each amplification cycle (from the 7th to 24th cycles), and the coamplified fragments were separated by acrylamide gel electrophoresis. The determination of the proportion of RAR $\alpha$ , RAR $\beta$ , RXR $\beta/\gamma$ , and tTG mRNA to  $\beta$ -actin mRNA was calculated according to the method of Chelly et al. (1990) by using a semilogarithmic representation of the relative extent of amplification measured by counting the amount of [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]deoxycytidine triphosphate incorporated. The oligonucleotide primers for the  $\beta$ -actin, RAR $\beta$ , RXR $\beta/\gamma$ , and tTG were the same as those previously used by Enderlin et al. (1997). The primers for RAR $\alpha$  were 5'-GCTGGGCAAGTACTACTCGAAC-3', corresponding to nucleotides 843 to 864, and 5'-GGCGAACTCCACAGTCTTAATG-3', corresponding to nucleotides 939 to 960 (Zelent et al., 1989). The identity and specificity of amplified products were verified by sequencing with the Dye Terminator Reaction Cycle Kit (Perkin-Elmer, Norwalk, CT) and were analyzed on an Abi Prism 377 automated DNA sequencer (Perkin-Elmer).

#### Blood Alcohol Level Assay

To determine blood alcohol levels, trunk blood was collected at the time of death. Ethanol solution was removed 3 hr before death to use the same experimental conditions as in the behavioral study. Blood alcohol concentrations were enzymatically determined with an alcohol dehydrogenase assay kit (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA) by using a Beckman Synchron CX analyzer.

#### The tTG Assay

Brain homogenates for the tTG assay were prepared as previously described by Alfós et al. (1996). The tTG-specific activity was measured by detecting the incorporation of [<sup>3</sup>H]putrescine into *N,N*'-dimethylcasein according to the method of Piacentini et al. (1986).

#### Statistical Analysis

Values are given as means  $\pm$  SEM. For the biochemical study, the statistical significance of differences between means was calculated by ANOVA followed by Student's *t* test by using Minitab statistical software (Minitab, Inc., State College, PA). Statistical analysis for the behavioral study was performed by using an ANOVA followed by an appropriate post hoc test (Scheffé's *F* test); *p* values  $\leq 0.05$  were considered significant.

## RESULTS

#### Nutrient and Alcohol Intake

As shown in Table 1, daily caloric intake provided by dry food in ethanol and pair-fed mice was inferior to that consumed by untreated animals. Nevertheless, as pair-fed and ethanol subjects consumed large amounts of dextrimaltose or ethanol solutions, the total caloric intake (dry food and liquid solution) was superior in these two groups compared with that consumed by the water group. However, it should be noted that experimental subjects did not exhibit any statistically significant differences in weight gain or body weight after 10 months of ethanol consumption ( $31.8 \pm 2.1$  g,  $33.9 \pm 1.3$  g, and  $32.7 \pm 2.2$  g for the ethanol, pair-fed, and water group, respectively).



**Table 1.** Mean Daily Caloric Intake as Dry Food and Liquid Solutions by the Water, Pair-Fed, and Ethanol Groups of Mice Used in the Study

Group	Mean caloric intake (kJ/kg/day)			Total
	Dry food	Dextri-maltose solution	Ethanol solution	
Water	334 $\pm$ 6 <sup>a</sup>	—	—	334 $\pm$ 6 <sup>a</sup>
Pair-fed	276 $\pm$ 11 <sup>b</sup>	131 $\pm$ 4	—	407 $\pm$ 10 <sup>b</sup>
Ethanol	284 $\pm$ 6 <sup>b</sup>	—	99 $\pm$ 5	383 $\pm$ 7 <sup>b</sup>

Values are mean  $\pm$  SEM from either 10 animals for the water and pair-fed groups or 20 animals for the ethanol group. It should be noted that in ethanol solution, 16.5 kJ were provided by saccharose and 82.5 kJ were provided by ethanol itself. Values not sharing the same superscript letter (a and b) are significantly different from each other,  $p < 0.05$  (Student's  $t$  test).

Mice consumed a mean of  $4.7 \pm 0.2$  ml of 12% ethanol solution per day, and this represents a mean of  $13.2 \pm 0.4$  g of ethanol per kilogram body weight per day. These results are in agreement with those of previous studies (e.g., Kishimoto et al., 1995; Whittington and Little, 1990).

### Blood Alcohol Levels

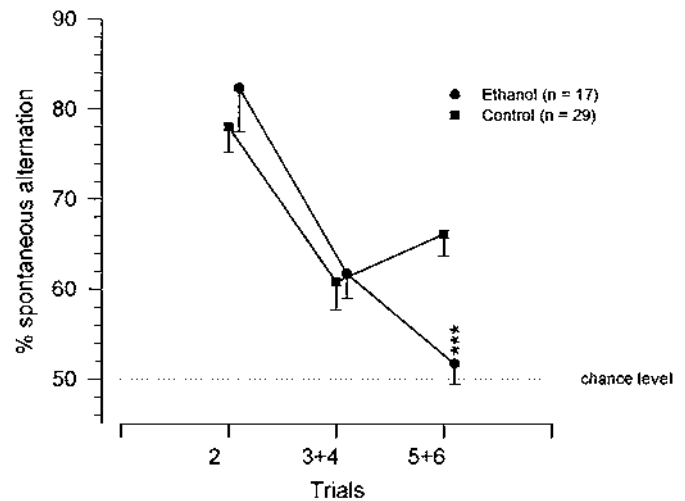
Blood alcohol levels were measured 3 hr after ethanol solution was removed between 10:00 and 11:00 AM. At this time, which corresponded to the beginning of the memory test, very low levels of ethanol were found in the blood of alcohol-treated mice (control,  $0.0 \pm 0.0$  mg/dl; ethanol,  $4.0 \pm 2.0$  mg/dl). Moreover, CD2665 administration to alcohol-treated mice did not modify blood alcohol levels.

### Mortality and Weight Gain Induced by the Treatments

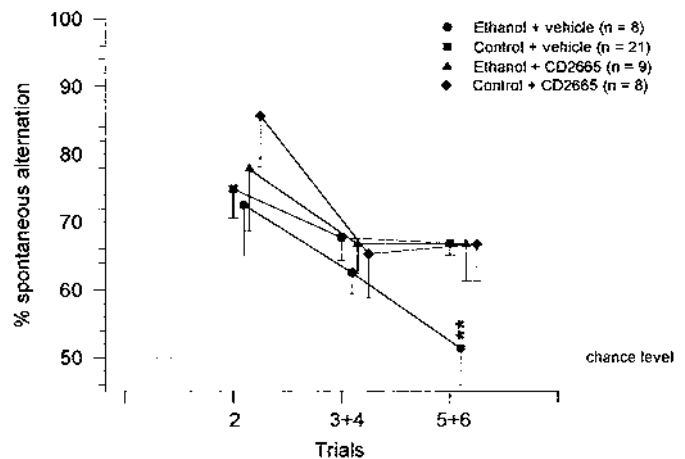
No mortality was encountered in ethanol, pair-fed, or water animals during alcohol or CD2665 treatments. Moreover, neither CD2665 (0.6 mg/kg/day) nor vehicle (polyethylene glycol/NaCl 9%/ethanol) administration for 22 days induced any statistically significant differences in body weight (i.e.,  $32.6 \pm 1.7$  vs.  $32.1 \pm 1.3$  g, respectively, before and after CD2665 treatment).

### Behavioral Study

**Effect of 10 Months of Ethanol Consumption on Working Memory.** Because no significant differences in the rates of spontaneous alternation were observed between the pair-fed and the water groups (all  $F < 1.0$ ), they were pooled as the control group for statistical analysis. As previously shown by Béracochéa et al. (1987), no significant differences were observed in running times and choice latencies between the control and the alcohol-treated groups. As shown in Fig. 2, animals displayed a progressive decrease in spontaneous alternation rates from the second to the last (trials 5 + 6) trials of the session [repeated measures,  $F(2,84) = 25.0, p < 0.001$ ]. However, whereas no significant between-group differences were observed on trial 2 and trials 3 + 4 ( $F = 0.65$ , not significant), the additional 5 + 6 trials resulted in a significant impairment of spontaneous alternation in the alcohol group ( $51.7 \pm 2.3\%$ ) with respect to the control group [ $66.1 \pm 2.6\%$ ,  $F(1,42) = 14.9, p < 0.001$ ].

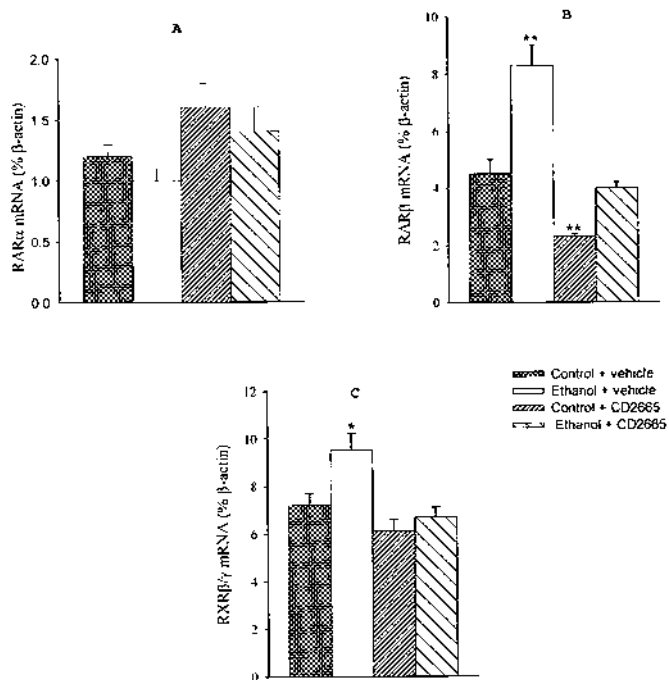


**Fig. 2.** Mean percentage ( $\pm$ SEM) of spontaneous alternation as a function of trials before CD2665 administration. Individual alternation scores recorded for eight consecutive days were averaged to determine the mean percentage alternation rate per trial corresponding to a given group. Post hoc Scheffé test: \*\*\*significantly different from the control group,  $p < 0.001$ .



**Fig. 3.** Mean percentage ( $\pm$ SEM) of spontaneous alternation as a function of trials after 22 days of CD2665 administration. Individual alternation scores recorded for eight consecutive days were averaged to determine the mean percentage alternation rate per trial corresponding to a given group. Post hoc Scheffé test: \*\*significantly different from the control group,  $p < 0.01$ .

**Effect of CD2665 Administration in Control and Ethanol-Treated Mice on Working Memory.** Results are summarized in Fig. 3. Because data analysis revealed no significant differences in the rates of spontaneous alternation between the pair-fed and the water-fed animals treated with polyethylene glycol/NaCl/ethanol (all  $F < 1.0$ ), they were also pooled as the control group for statistical analysis. As in the previous set of measures, there was an overall decrease in spontaneous alternation rates from the second to the last two trials of the session [repeated measures,  $F(2,80) = 7.40, p < 0.01$ ], with between-group differences emerging on trials 5 + 6 [ $F(3,40) = 3.30, p < 0.05$ ] but not before (trial 2 and trials 3 + 4,  $F < 1.0$ ). Specifically, the impairment of spontaneous alternation rates produced by alcohol consumption with respect to controls ( $51.3 \pm 5.5\%$  vs.  $66.8$

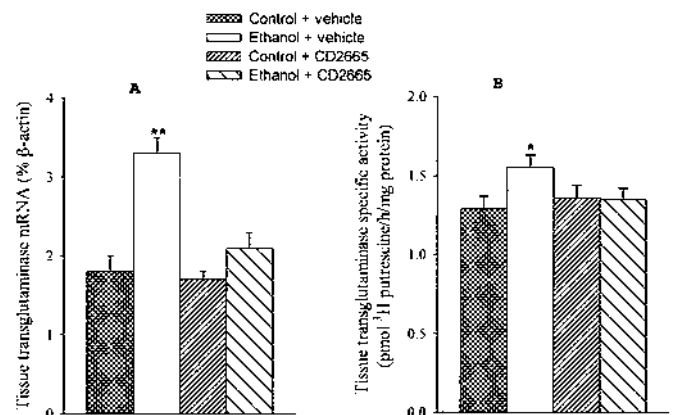


**Fig. 4.** Effect of CD2665 administration on the expression of RAR $\alpha$  (A), RAR $\beta$  (B), and RXR $\beta/\gamma$  (C) mRNA in control and alcohol-treated mouse brain. Data bars represent mean  $\pm$  SEM of measures performed on three independent samples ( $n = 3$ ) of two pooled whole brains per group (i.e., a total of six animals). \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  (Student's  $t$  test), significantly different from the control group.

$\pm 1.7\%$ ,  $p < 0.01$ ) was totally reversed by the administration of CD2665 (alcohol + CD2665 =  $66.7 \pm 5.5\%$  versus alcohol + placebo =  $51.3 \pm 5.5\%$ ,  $p < 0.02$ ). Conversely, CD2665 administration to control animals did not produce any significant change in the rate of spontaneous alternation (control + CD2665 =  $66.6 \pm 5.5\%$  versus control + placebo =  $66.8 \pm 1.7\%$ , not significant).

### Neurochemical Study

**Effect of CD2665 Administration on Brain RAR $\alpha$ , RAR $\beta$ , and RXR $\beta/\gamma$  mRNA Expression in Control and Alcohol-Treated Mice.** Because no significant differences in the expression level of brain RAR $\alpha$ , RAR $\beta$ , or RXR $\beta/\gamma$  were observed between the pair-fed and the water groups, they were pooled as the control group for statistical analysis. As shown in Fig. 4, mice submitted to 10 months of ethanol consumption displayed a significant increase in brain RAR $\beta$  mRNA (+84% versus control,  $p < 0.01$ ) and RXR $\beta/\gamma$  mRNA (+32% versus control,  $p < 0.05$ ), but they displayed no significant modification of RAR $\alpha$  mRNA levels. The administration of a RAR $\beta$  antagonist to control mice produced a decrease only in brain RAR $\beta$  mRNA levels ( $-50\%$  relative to control,  $p < 0.01$ ), without any change in RXR $\beta/\gamma$  mRNA levels, and produced a slight but not statistically significant increase in RAR $\alpha$  mRNA levels. Moreover, our results clearly showed that the overexpression of both RAR $\beta$  and RXR $\beta/\gamma$  mRNA was totally suppressed in alcohol-treated mouse brain by RAR $\beta$  antagonist administration.



**Fig. 5.** Effect of CD2665 administration on the mRNA expression (A) and specific enzymatic activity (B) of tissue transglutaminase (tTG) in control and alcohol-treated mouse brain. Data bars represent mean  $\pm$  SEM of measures performed either on three independent samples ( $n = 3$ ) of two pooled whole brains per group (i.e., a total of six animals) for mRNA quantification or on four whole brains for tTG activity assay. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  (Student's  $t$  test), significantly different from the control group.

### Effect of CD2665 Administration on Brain tTG Activity and mRNA Expression in Control and Alcohol-Treated Mice.

Results concerning tTG are summarized in Fig. 5. As previously, no significant differences in tTG expression level or specific enzymatic activity were observed between the pair-fed and the water groups. Ten months of ethanol consumption in C57Bl/6 mice produced a significant increase in both brain tTG mRNA expression (+88% versus control,  $p < 0.01$ ) and specific enzymatic activity (+20% versus control,  $p < 0.05$ ). CD2665 administration for 22 days to control mice did not produce any change in tTG mRNA expression or specific enzymatic activity in the brain. However, the same treatment to alcohol-treated mice produced a significant decrease in both tTG mRNA expression and enzymatic activity and normalized the expression levels to those seen in control mice.

### DISCUSSION

In the first part of our study, we investigated the spatial memory performances of alcohol-treated mice on spontaneous alternation. Our results show that 10 months of ethanol treatment in C57Bl/6 mice produced a significant impairment of spontaneous alternation behavior. This result agrees with several reports that show that alcohol treatment disrupts spontaneous alternation in rodents (Béracochéa et al., 1987; Stone et al., 1996; Walker et al., 1981). Experimental mice alternated at normal rates on the second to fourth trials, with additional trials being required to reveal the deficit. Moreover, the deficit was mostly observed after alternated choices. Similar results were previously observed by Béracochéa et al. (1987) in BALB/c mice submitted to the same alcohol treatment for 12 months. It has been postulated that long-term ethanol consumption impairs alternation because it increases the animal's vulnerability to interferences (Béracochéa et al., 1987). Be-

cause animals were not submitted to a long period of withdrawal (e.g., several weeks) before behavioral testing, it may be that acute ethanol intoxication is responsible for the memory deficit. However, the results of the blood alcohol concentration assay 3 hr after ethanol solution was removed indicate that very low levels of ethanol were detected in the blood before the beginning of the behavioral test. Moreover, the mice did not present any signs of withdrawal after ethanol removal, such as tremor or convulsive behavior induced by handling during the working memory task. In fact, it has been shown that mice voluntarily consume ethanol at night simultaneously with food intake (Dole et al., 1985). Thus, in these experimental conditions, the working memory deficit observed in alcohol-treated mice cannot be the result of an acute effect of ethanol but must be considered as an effect of long-term ethanol abuse.

This spatial working memory deficit observed in alcohol-treated mice was associated with an overexpression of brain RAR $\beta$  mRNA; this confirms previous studies from our laboratory that show that chronic ethanol consumption increases RAR $\beta$  mRNA amounts in the brain and liver of C57Bl/6 mice (Alfos et al., 1996; Pallet et al., 1993). Moreover, this study provides the first evidence that chronic alcohol consumption induces an overexpression of RXR $\beta/\gamma$  mRNA in mouse brain. This is of major importance because RAR-RXR heterodimers have been shown to be the functional units for transducing retinoic acid signaling and because RXR is the common partner of several nuclear hormone receptors (Kastner et al., 1997). However, the expression of RAR $\alpha$  mRNA, which is expressed in adult brain to a lesser extent than RAR $\beta$  (Kato et al., 1992; Krezel et al., 1999), is unaffected by ethanol treatment. It is well known that RAR $\beta$ , but not RAR $\alpha$ , is up-regulated by its own ligand, retinoic acid, in several organs, including the brain (Kato et al., 1992; Yamagata et al., 1993). Moreover, it has been shown that retinoic acid can increase RXR $\beta/\gamma$  mRNA expression in adult mouse brain (Enderlin et al., 1997). Thus, the increase in RAR $\beta$  observed in alcohol-treated mouse brain could be the result of an increased amount of retinoic acid. Indeed, Ullman et al. (1997) have reported that ethanol induces a strong increase in all-*trans* and 9-*cis* retinoic acid synthesis in cerebellar astrocyte cultures. More recently, these authors demonstrated in vivo that ethanol induces an increase in retinoic acid synthesis in the cerebellum and a decrease in the cerebral cortex of adult rats (Ullman et al., 1998). Other authors have reported that the adult brain can synthesize retinoic acid (Connor and Sidell, 1997; Dev et al., 1993; McCaffery and Dräger, 1994) and that enzymes involved in the retinoic acid synthesis pathway could be stimulated by ethanol, especially the microsomal retinol dehydrogenase (Boerman and Napoli, 1996), the cytosolic retinal dehydrogenase (Leo et al., 1989), and cytochrome P-450 1A1 and 1A2 (Roberts et al., 1995). These data argue

in favor of an increased retinoic acid synthesis in certain brain structures during long-term ethanol consumption in adult mice.

In this study we also investigated the expression of tTG as an indicator of retinoid action (Verma et al., 1992). Our results show an increase in brain tTG enzymatic activity after 10 months of ethanol consumption, and this confirms our previous study (Alfos et al., 1996). Sessa et al. (1997) have also shown that 4 months of ethanol consumption in rats causes a 200% increase in brain tTG enzymatic activity. This increase is substantially (10-fold) higher than the increase observed in our study. Our method of ethanol administration resulted in an average daily intake of  $13.2 \pm 0.4$  g of alcohol per kilogram body weight, which represents approximately 20% of the total caloric intake. This is quite moderate compared with other alcoholization models in which ethanol comprises 35–40% of the available calories (Lieber and De Carli, 1994; Walker et al., 1981). Because Sessa et al. (1997) used the Lieber-De Carli ethanol diet in their study, the difference in the alcoholization procedures between the two studies could explain the major differences observed in tTG activity induction. The originality of our study is that we also measured an induction of brain tTG mRNA expression after chronic ethanol consumption. This increase in brain tTG mRNA expression agrees with the RAR $\beta$  and RXR $\beta/\gamma$  overexpression; it is now well established that retinoid status influences tTG expression in several organs (Verma et al., 1992) because of a retinoic acid response element located in the promoter of this gene (Nagy et al., 1996).

The main result of our study concerns the neurochemical and behavioral effects of CD2665 administration. As expected, CD2665 decreased RAR $\beta$  mRNA expression both in control and alcohol-treated mouse brain without altering RAR $\alpha$  mRNA levels. Indeed, this RAR antagonist is specific to the RAR $\beta$  isoform (Szondy et al., 1997). However, the functional consequences of CD2665 administration on tTG expression and on working memory were different in control and alcohol-treated mice. In normal mice, CD2665 treatment affected neither tTG expression nor working memory, despite a 50% decrease in brain RAR $\beta$  mRNA level. These results could seem surprising in view of the recent data concerning the involvement of retinoid receptors in higher memory function in adult mice. Indeed, Chiang et al. (1998) have shown that RXR $\gamma$ /RAR $\beta$  knockout mice exhibit substantial performance deficits in a spatial memory task. More recently, we demonstrated that brain aging in mice is associated with a hypofunction of RAR $\beta$  and RXR $\beta/\gamma$  signaling pathways and with a specific age-related memory deficit that can be alleviated by retinoic acid administration (Etchamendy et al., 2001). However, contrary to these studies, CD2665 treatment decreased only the brain RAR $\beta$  signaling pathway but not the RXR signaling pathway. It has been shown that RXR plays a crucial role as a heterodimeric partner for a number of



nuclear receptors, including RAR (Chambon, 1996; Mangelsdorf and Evans, 1995). Thus, it is probable that the sole decrease in RAR $\beta$  in normal mouse brain in our experimental conditions is not sufficient to induce functional alterations. This hypothesis is in agreement with the lack of effect of CD2665 administration on *tTG* expression, a gene known to be optimally induced by RAR/RXR heterodimers (Nagy et al., 1996). Moreover, our results show that CD2265 treatment induces a slight, but not significant, increase in RAR $\alpha$  mRNA expression, which could compensate for the RAR $\beta$  decrease.

In ethanol-treated mice, our results clearly demonstrate that administration of a RAR $\beta$  antagonist suppresses the overexpression of both RAR $\beta$  and RXR $\beta/\gamma$  mRNA in the brain. The molecular mechanisms leading to the inhibition of RXR $\beta/\gamma$  overexpression by CD2665 administration remain undefined. Nevertheless, a direct effect of CD2665 on RXR $\beta/\gamma$  may be excluded because the affinity of this compound for these receptors is very low:  $K_d > 1000$  nM (Szondy et al., 1997). The functional consequence of the normalization of these signaling pathways by CD2665 administration is a complete reversal of the working memory deficit observed in ethanol-treated mice. It has been known for a long time that maternal hypervitaminosis A induces learning impairments in newborns [for a review, see Adams (1993)], and, as previously discussed, recent data demonstrate that RAR hypsignaling in adult mice may result in memory deficits (Chiang et al., 1998; Etchamendy et al., 2001). In contrast, little is known regarding the behavioral effects of RAR overexpression in adult brain. However, our results suggest that RAR $\beta$  and RXR $\beta/\gamma$  overexpression may, at least in part, be responsible for the working memory deficit observed during chronic ethanol consumption. Taken together, these data suggest that in adult brain, an optimal range of retinoic acid (and consequently of RARs) is necessary for normal memory function. It is noteworthy that dysregulation in retinoid transcription events has also been considered as a potential etiological factor in neurodevelopmental diseases such as schizophrenia (Goodman, 1998) or neurodegenerative disorders such as Alzheimer's disease (Connor and Sidell, 1997). The question that arises is how retinoid receptor overexpression might contribute to memory deficits during chronic ethanol consumption. Because retinoid receptors function as transcription factors, it is quite probable that retinoid receptor overexpression induces an altered regulation of target genes that are critical for memory processes. Several genes regulated by retinoic acid and involved in neurobiological functions have been characterized, such as the D<sub>2</sub> dopamine receptor (Krezel et al., 1998), the NMDA receptor (Beczowska et al., 1996), the protein kinase C substrate neurogranin (Enderlin et al., 1997), the calmodulin kinase II (Chen and Kelly, 1996), and a variety of cholinergic-specific proteins [for a review, see Malik et al. (2000)]. We hypothesize that the administration of CD2665 normalizes the expression of retinoic acid target genes in alcohol-treated mice by blocking RAR $\beta$  and

RXR $\beta/\gamma$  overexpression. Our results concerning *tTG* agree with this hypothesis because CD2665 administration to alcohol-treated mice corrects *tTG* expression levels. Moreover, *tTG* could also be one of the retinoic acid target genes involved in memory processes because it has been reported that this enzyme plays a role in long-term potentiation and synaptic transmission [see the review in Lesort et al. (2000)].

In conclusion, our results suggest that the fine regulation of retinoid signaling pathways is fundamentally important for optimal brain functioning and memory. Specifically, an overexpression of brain RARs, mainly RAR $\beta$  and RXR $\beta/\gamma$ , induced by chronic ethanol consumption might, at least in part, be a potential etiological factor responsible for some cognitive deterioration. Additional studies are under way to identify retinoic acid target genes dysregulated during chronic ethanol consumption and potentially involved in the working memory deficit observed in this study.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. U. Reichert (Galderma/R.D., Sophia-Antipolis, France) for providing them with the RAR antagonist CD2665 and Ray Cook for his helpful suggestions for the English version.

#### REFERENCES

- Adams J (1993) Structure-activity and dose-response relationships in the neural and behavioral teratogenesis of retinoids. *Neurotoxicol Teratol* 15:193–202.
- Alfos S, Higuieret P, Pallet V, Higuieret D, Garcin H, Jaffard R (1996) Chronic ethanol consumption increases the amount of mRNA for retinoic acid and triiodothyronine receptors in mouse brain. *Neurosci Lett* 206:73–76.
- Beczowska IW, Buck J, Inturrisi CE (1996) Retinoic acid-induced increase in delta-opioid receptor and N-methyl-D-aspartate receptor mRNA levels in neuroblastoma x glioma (NG108–15) cells. *Brain Res Bull* 39:193–199.
- Béracochéa D, Jaffard R (1987) Impairment of spontaneous alternation behavior in sequential test procedures following mammillary body lesions in mice: evidence for time-dependent interference-related memory deficits. *Behav Neurosci* 101:187–197.
- Béracochéa D, Krazem A, Jaffard R (1995) Methyl beta-carbonyl-3carboxylate reverses the working memory deficits induced either by chronic alcohol consumption or mammillary body lesions in BALB/c mice. *Psychobiology* 23:52–58.
- Béracochéa D, Lescaudron L, Tako A, Verna A, Jaffard R (1987) Build-up and release from proactive interference during chronic ethanol consumption in mice: a behavioral and neuroanatomical study. *Behav Brain Res* 25:63–74.
- Boerman MHEM, Napoli JL (1996) Cellular retinol-binding protein-supported retinoic acid synthesis: relative roles of microsomes and cytosol. *J Biol Chem* 271:5610–5616.
- Chambon P (1996) A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J* 10:940–954.
- Chelly J, Montarras D, Pinset C, Berwald-Netter Y, Kaplan JC, Kahn A (1990) Quantitative estimation of minor mRNAs by cDNA-polymerase chain reaction. Application to dystrophin mRNA in cultured myogenic and brain cells. *FEBS Lett* 187:691–698.

- Chen J, Kelly PT (1996) Retinoic acid stimulates  $\alpha$ CAMKII gene expression in PC12 cells at a distinct transcription initiation site. *J Neurosci* 16:5704–5714.
- Chiang M-Y, Misner D, Kempermann G, Schikorski T, Giguere V, Sucov HM, Gage FH, Stevens CF, Evans RM (1998) An essential role for retinoid receptors RAR $\beta$  and RXR $\gamma$  in long-term potentiation and depression. *Neuron* 21:1353–1361.
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156–159.
- Connor MJ, Sidell N (1997) Retinoic acid synthesis in normal and Alzheimer diseased brain and human neural cells. *Mol Chem Neuropathol* 30:239–252.
- Dev S, Adler AJ, Edwards RB (1993) Adult rabbit brain synthesizes retinoic acid. *Brain Res* 632:325–328.
- Dole WP, Ho A, Gentry RT (1985) Toward an analogue of alcoholism in mice: criteria for recognition of pharmacologically motivated drinking. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:3469–3471.
- 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* 229:115–129.
- Etchamendy N, Enderlin V, Marighetto A, Vouimba RM, 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* 21:6423–6429.
- Fadda F, Rossetti ZL (1998) Chronic alcohol consumption: from neuroadaptation to neurodegeneration. *Prog Neurobiol* 56:385–431.
- Frank O, Luisada-Opper A, Sorrell MF, Zetterman R, Baker H (1976) Effects of a single intoxicating dose of ethanol on the vitamin profile of organelles in rat liver and brain. *J Nutr* 106:606–614.
- Goodman AB (1998) Three independent lines of evidence suggest retinoids as causal to schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:7240–7244.
- Grant DS (1981) Intertrial interferences in rat short-term memory. *J Exp Psychol* 7:217–227.
- Kastner P, Mark M, Ghyselinck N, Krezel W, Dupe V, Grondona JM, Chambon P (1997) Genetic evidence that the retinoid signal is transduced by heterodimeric RXR/RAR functional units during mouse development. *Development* 124:313–326.
- 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* 286:755–760.
- Kishimoto R, Fujiwara I, Kitayama S, Goda K, Nakata Y (1995) Changes in hepatic enzyme activities related to ethanol metabolism in mice following chronic ethanol administration. *J Nutr Sci Vitaminol* 41:527–543.
- Krezel W, Ghyselinck N, Samad TA, Dupé V, Kastner P, Borrelli E, Chambon P (1998) Impaired locomotion and dopamine signaling in retinoid receptor mutant mice. *Science* 279:863–867.
- Krezel W, Kastner P, Chambon P (1999) Differential expression of retinoid receptors in the adult mouse central nervous system. *Neuroscience* 89:1291–1300.
- Leo MA, Kim CI, Lieber CS (1986) Increased vitamin A in esophagus and other extrahepatic tissues after chronic ethanol consumption in the rat. *Alcohol Clin Exp Res* 10:487–492.
- Leo MA, Kim CI, Lowe N, Lieber CS (1989) Increased hepatic retinal dehydrogenase activity after phenobarbital and ethanol administration. *Biochem Pharmacol* 38:97–103.
- Lesort M, Tucholski J, Miller ML, Johnson GVW (2000) Tissue transglutaminase: a possible role in neurodegenerative diseases. *Prog Neurobiol* 61:439–463.
- Lieber CS, De Carli LM (1994) Animal models of chronic ethanol toxicity. *Methods Enzymol* 233:585–594.
- Malik MA, Blusztajn JK, Greenwood CE (2000) Nutrients as trophic factors in neurons and the central nervous system: role of retinoic acid. *J Nutr Biochem* 11:2–13.
- Mangelsdorf DJ, Borgmeyer U, Heyman RA, Zhou JY, Ong ES, Oro AE, Kakizuka A, Evans RM (1992) Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-*cis*-retinoic acid. *Genes Dev* 6:329–344.
- Mangelsdorf DJ, Evans RM (1995) The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 83:841–850.
- Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM (1995) The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83:835–839.
- McCaffery P, Dräger UC (1994) High levels of a retinoic acid-generating dehydrogenase in the meso-telencephalic dopamine system. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:7772–7776.
- Nagy L, Saydak M, Shipley N, Lu S, Basilion JP, Yan ZH, Syka P, Chandraratna RAS, Stein JP, Heyman RA, Davies PJA (1996) Identification and characterization of a versatile retinoid response element (retinoic acid response element-retinoid X receptor response element) in the mouse tissue transglutaminase gene promoter. *J Biol Chem* 271:4355–4365.
- Oscar-Berman M, Shagrin B, Evert DL, Epstein C (1997) Impairments of brain and behavior: the neurological effects of alcohol. *Alcohol Health Res World* 21:65–75.
- Pallet V, Coustaut M, Naulet F, Higuieret D, Garcin H, Higuieret P (1993) Chronic ethanol administration enhances retinoic acid and triiodothyronine receptor expression in mouse liver. *FEBS Lett* 331:119–122.
- Piacentini M, Sartori C, Beninati S, Bargagli AM, Argento-Cerù MP (1986) Ornithine decarboxylase, transglutaminase, diamine oxidase and total diamines and polyamines in maternal liver and kidney throughout rat pregnancy. *Biochem J* 234:435–440.
- Putzke J, De Beun R, Schreiber R, De Vry J, Tölle TR, Zieglansberger W, Spanagel R (1998) Long-term alcohol self-administration and alcohol withdrawal differentially modulate microtubule-associated protein 2 (MAP2) gene expression in the rat brain. *Mol Brain Res* 62:196–205.
- Roberts BJ, Shoaf SE, Song BJ (1995) Rapid changes in cytochrome P4502E1 (CYP2E1) activity and other P450 isozymes following ethanol withdrawal in rats. *Biochem Pharmacol* 49:1665–1673.
- Ross SA, McCaffery PJ, Dräger UC, De Luca L (2000) Retinoids in embryonal development. *Physiol Rev* 80:1021–1054.
- Sato M, Lieber CS (1981) Hepatic vitamin A depletion after chronic ethanol consumption in baboons and rats. *J Nutr* 111:2015–2023.
- Seitz HK, Suter PM (1994) Ethanol toxicity and nutritional status, in *Nutritional Toxicology* (Kotsonis FN, Mackey M, Hjelle J eds), pp 95–115. Raven Press, New York.
- Sessa A, Tunici P, Rabellotti E, Perin A (1997) Transglutaminase activity in rat brain after chronic ethanol exposure. *Alcohol Clin Exp Res* 21:1241–1245.
- Sporn MB, Roberts AB, Goodman DS (1994) *The Retinoids: Biology, Chemistry, and Medicine*. 2nd ed. Raven Press, New York.
- Stone WS, Altman HJ, Hall J, Arankowsky-Sandoval G, Parekh P, Gold PE (1996) Prenatal exposure to alcohol in adult rats: relationships between sleep and memory deficits, and effects of glucose administration on memory. *Brain Res* 742:98–106.
- Szondy Z, Reichert U, Bernardon J-M, Michel S, Tóth R, Ancian P, Ajzner E, Fesus L (1997) Induction of apoptosis by retinoids and retinoic acid receptor  $\gamma$ -selective compounds in mouse thymocytes through a novel apoptosis pathway. *Mol Pharmacol* 51:972–982.
- Ullman MD, McCaffery P, Evans J, Koul O, McCluer RH (1998) Ethanol increases cerebellar and decreases cortical retinoic acid concentration of postnatal rat brain (abstract). *Alcohol Clin Exp Res* 22:55A.

- Ullman MD, McCaffery P, Koul O, Sajdel-Sulkowska E, McCluer RH (1997) Ethanol effects on retinoic acid production in cerebellar astrocyte cultures (abstract). *Alcohol Clin Exp Res* 21:84A.
- Verma AK, Shoemaker A, Simsiman R, Denning M, Zachman R (1992) Expression of retinoic acid nuclear receptors and tissue transglutaminase is altered in various tissues of rats fed with a vitamin A-deficient diet. *J Nutr* 122:2144–2152.
- Walker DW, Hunter BE, Abraham WC (1981) Neuroanatomical and functional deficits subsequent to chronic ethanol administration in animals. *Alcohol Clin Exp Res* 5:267–282.
- Wang X-D (1999) Chronic alcohol intake interferes with retinoid metabolism and signaling. *Nutr Rev* 57:51–59.
- Whittington MA, Little HJ (1990) Patterns of changes in field potentials in the isolated hippocampal slice on withdrawal from chronic ethanol treatment of mice in vivo. *Brain Res* 523:237–244.
- Yamagata T, Momoi T, Kumagai H, Nishikawa T, Yanagisawa M, Momoi M (1993) Distribution of retinoic acid receptor  $\beta$  in rat brain: up-regulation by retinoic acid. *Biomed Res* 14:183–190.
- Zelent A, Krust A, Petkovich M, Kastner P, Chambon P (1989) Cloning of murine  $\alpha$  and  $\beta$  retinoic acid receptors and a novel receptor  $\gamma$  predominantly expressed in skin. *Nature* 339:714–717.
- Zetterström RH, 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.



## **Conclusion**

*En résumé, cette étude nous a permis de mettre en évidence que l'administration d'un antagoniste spécifique du récepteur nucléaire  $RAR\beta$  (CD2665) à des animaux alcoolisés supprime la surexpression des récepteurs de l'AR ( $RAR\beta$ ,  $RXR\beta/\gamma$ ) et entraîne une amélioration de certaines performances mnésiques. C'est pourquoi on peut envisager que la surexpression des RARs dans le cerveau, et principalement des  $RAR\beta$  et  $RXR\beta/\gamma$ , induite par une consommation chronique d'alcool, contribue à l'apparition de certains troubles mnésiques.*

On peut alors s'interroger sur le mécanisme par lequel une modification du niveau d'expression des récepteurs nucléaires de l'AR, dans le cerveau de souris alcoolisées, génère un déficit de mémoire. Il est aujourd'hui bien admis que les récepteurs nucléaires de l'AR régulent l'expression de nombreux gènes impliqués dans des processus neurobiologiques parmi lesquels la tTG (Lesort et coll., 2000), le récepteur D2 dopaminergique (Krezel et coll., 1998), le récepteur NMDA (Beczowska et coll., 1996), des protéines impliquées dans la transmission cholinergique (Castell et coll., 2002), mais aussi GAP-43 (Encinas et coll., 2000) et RC3 (Iñiguez et coll., 1994). Nous pouvons donc suggérer que la surexpression des récepteurs de l'AR, induite par l'alcool, entraîne une dérégulation de l'expression de gènes cibles impliqués dans les processus neurobiologiques qui sous-tendent les processus cognitifs. Des résultats récents montrent que c'est notamment le cas pour l'expression du gène codant pour GAP-43 (Casoli et coll., 2001).

La découverte du rôle de la vitamine A dans les processus cognitifs (Chiang et coll., 1998 ; Etchamendy et coll., 2001) a suscité un fort courant de recherche qui vise à préciser l'intervention des récepteurs nucléaires dans les processus neurobiologiques et cognitifs. A ce jour, un ensemble de données cohérentes suggère qu'un niveau optimum de l'activité de la voie de signalisation des rétinoïdes est requis pour le maintien de certaines capacités mnésiques. A titre d'exemple nous avons montré que l'administration d'AR à des animaux âgés réactive cette voie de signalisation sous-exprimée dans leur cerveau et entraîne la suppression de troubles mnésiques spécifiques (Etchamendy et coll., 2001).

Confrontés à nos premiers résultats ces données suggèrent la possibilité, chez l'animal âgé, d'une réactivation de la voie d'action de l'AR par une alcoolisation chronique et de répercussion sur les performances mnésiques.

Nous avons éprouvé cette hypothèse en soumettant des animaux âgés à une alcoolisation chronique. Les résultats obtenus font l'objet du chapitre suivant.

**CHAPITRE III**

**ETUDE DES EFFETS D'UNE CONSOMMATION CHRONIQUE**  
**D'ALCOOL SUR L'ACTION CELLULAIRE DE L'ACIDE**  
**RETINOÏQUE ET DE LA TRIODOTHYRONINE AU COURS DU**  
**VIEILLISSEMENT CEREBRAL**





## **Chapitre III**

### **ETUDE DES EFFETS D'UNE CONSOMMATION CHRONIQUE D'ALCOOL<sup>1</sup> SUR L'ACTION CELLULAIRE DE L'ACIDE RETINOÏQUE ET DE LA TRIIODOTHYRONINE AU COURS DU VIEILLISSEMENT CEREBRAL**

Des études épidémiologiques ont montré une moindre fréquence des troubles cognitifs liés à l'âge chez des buveurs modérés de boissons alcoolisées (Expertise collective de l'INSERM, 2001).

Par ailleurs, des résultats obtenus en collaboration avec le laboratoire de Neurosciences Cognitives ont montré (1) que le vieillissement cérébral normal entraîne un déficit cognitif sélectif de la mémoire relationnelle (équivalente de la mémoire déclarative humaine), (2) qu'une réactivation des voies de signalisation de la vitamine A et de l'hormone thyroïdienne (T3), déprimées dans le cerveau de l'animal âgé, supprime totalement et sélectivement ce déficit (Etchamendy et coll., 2001). D'autre part, nous avons aussi montré la suractivation de ces voies de signalisation chez des animaux adultes soumis à une consommation chronique d'alcool (Alfos et coll., 2001).

Ces différentes données suggèrent que la consommation d'alcool peut, dans certaines conditions, et via l'activation des voies de signalisation de l'acide rétinoïque et de la triiodothyronine, diminuer le risque d'apparition ou atténuer les troubles cognitifs associés au vieillissement. Cette hypothèse a été éprouvée dans la suite de ce travail.

Les résultats de cette étude font l'objet de la publication 2.

---

<sup>1</sup> Ethanol à 12% (volume/volume) apporté dans l'eau de boisson des animaux.

## **Méthodologie utilisée**

Des souris mâles de la lignée C57Bl/6, adultes (6 mois) ou âgées (17 mois), ont été soumis à une alcoolisation chronique (éthanol 12% (v/v)) pendant 5 mois. Cette consommation d'alcool correspond à une valeur moyenne de 13 g/kg/jour et fournit environ 20% de l'apport calorique total.

En fin de période d'alcoolisation, nous avons mesuré le niveau d'activité des voies de l'AR et de la T3, dans le cerveau, d'une part en quantifiant le taux des ARNm des récepteurs nucléaires (RAR $\alpha$ , RAR $\beta$ , RXR $\beta/\gamma$  et TR $\alpha/\beta$ ) et, d'autre part, en évaluant le niveau d'expression (ARNm et protéines) de différents gènes cibles : la transglutaminase tissulaire (tTG) et la neuromoduline (GAP-43) (gènes cibles de l'AR) et la neurogranine (RC3) (gène cible de l'AR et de la T3).

## **Principaux résultats**

### **Expression des récepteurs nucléaires de l'AR et de la T3**

Nos résultats montrent une diminution significative des récepteurs nucléaires (RAR $\alpha$ , RAR $\beta$ , RXR $\beta/\gamma$  et TR $\alpha/\beta$ ) dans le cerveau des souris âgées, par rapport aux souris adultes. Ces résultats sont en accord avec ceux déjà obtenus au laboratoire (Enderlin et coll., 1997a ; Etchamendy et coll., 2001).

La consommation chronique d'alcool induit une surexpression des ARNm des RAR $\beta$ , RXR $\beta/\gamma$  et TR $\alpha/\beta$  dans le cerveau des animaux adultes. Ces résultats sont aussi en accord avec les données antérieures (Alfos et coll., 1996 ; Alfos et coll., 2001). Chez les animaux âgés soumis à une alcoolisation chronique nous mesurons une augmentation de l'expression des récepteurs TR $\alpha/\beta$  et RAR $\beta$  qui devient alors comparable à celle des animaux adultes. En revanche, la consommation d'alcool n'a pas de répercussion sur l'expression du RAR $\alpha$ , quel que soit l'âge des animaux

**Expression de gènes cibles de l'AR et de la T3**

Nos résultats montrent une diminution de l'expression de GAP-43 et RC3 (ARNm et protéines) et une diminution de l'activité enzymatique de la tTG dans le cerveau des souris âgées par rapport aux souris adultes. Ces données sont cohérentes avec les résultats concernant la baisse de l'expression des récepteurs nucléaires chez les souris âgées.

La consommation chronique d'alcool s'accompagne d'une augmentation de l'activité de la tTG, quel que soit l'âge des animaux. De plus, les souris adultes alcoolisées présentent une augmentation faible mais significative du taux des ARNm de RC3, sans modification détectable de son niveau protéique. Dans le cerveau des animaux adultes, l'alcool ne modifie pas le niveau d'expression de GAP-43 (ARNm et protéine).

Les souris âgées alcoolisées présentent une augmentation de l'expression de RC3 et de GAP-43 (ARNm et protéines) par rapport aux souris âgées appariées.



**PUBLICATION 2**

**ETHANOL CONSUMPTION REVERSES THE AGE-RELATED  
HYPO-EXPRESSION OF TRIIODOTHYRONINE AND RETINOIC ACID NUCLEAR  
RECEPTORS AND ASSOCIATED TARGET GENES CODING FOR NEUROGRANIN AND  
NEUROMODULIN IN MOUSE BRAIN**



**Ethanol consumption reverses the age-related hypo-expression of triiodothyronine and retinoic acid nuclear receptors and associated target genes coding for neurogranin and neuromodulin in mouse brain.**

*(soumise à Mechanisms of Ageing and Development)*

Catherine Boucheron, Serge Alfos, Valérie Enderlin, Marianne Husson, Véronique Pallet, Paul Higeret

Unité de Nutrition et Signalisation Cellulaire (EA MENRT; USC INRA) ISTAB, Université Bordeaux 1, 33405 Talence cedex, France.

## ABSTRACT

The effects of 5-month ethanol consumption [12% in drinking water] on retinoic acid nuclear receptors (RAR and RXR), triiodothyronine nuclear receptors (TR) and associated target genes involved in synaptic plasticity, neurogranin (RC3) and neuromodulin (GAP-43), were investigated in adult and aged C57BL/6 mouse brains. For this purpose, the expression of RAR, RXR, TR, RC3 and GAP-43 mRNA was measured using a real-time RT-PCR method. GAP-43 and RC3 protein levels were measured by western blot. Results showed that ethanol consumption in adult mice (11 months) induced an increase in RAR $\beta$ , RXR $\beta\gamma$  and TR $\alpha\beta$  mRNA level in the brain with only an increase in RC3 expression. Whereas, the same ethanol consumption in aged mice (22 months) produced an increase in brain RAR $\beta$ , TR $\alpha\beta$  and target genes RC3 and GAP-43 which reversed their age-related decrease. Compared with previous behavioural data indicating that ethanol is able to partially suppress a selective age-related cognitive deficit, the present results suggest that ethanol acts by increasing the retinoid and triiodothyronine nuclear receptors, which in turn restored synaptic plasticity-associated target genes altered in aging brains. These results strongly suggest that fine regulation of retinoid and thyroid hormone mediated gene expression is essential for optimal brain functioning.

**Key Words:** retinoic acid nuclear receptors, triiodothyronine nuclear receptors, RC3, GAP-43, ethanol consumption, mouse brain.



## 1. INTRODUCTION

Brain aging is associated with neuro-anatomical and functional changes, which emerge from multiple factors among which nutritional and/or hormonal status may play a major role. It is now clearly established that nutrients, such as vitamin A, and hormones, such as thyroid hormone, are in close interaction and play a key role in gene expression through their nuclear receptors (Dauncey *et al.*, 2001).

Vitamin A is a micronutrient with an unusually wide biological scope of action including morphogenesis, vision, immune function, reproduction, neuronal development, and maintenance of differentiative functions (Sporn *et al.*, 1994). Cellular effects of vitamin A are mainly mediated through the binding of its active metabolite, retinoic acid (RA), to nuclear receptors (Chambon, 1996). Two classes of nuclear receptors have been identified: retinoic acid receptors (RAR $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ ), which are able to bind all-*trans* and 9-*cis* stereoisomers of retinoic acid, and retinoid X receptors (RXR $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ ), which specifically bind 9-*cis* retinoic acid (Mangelsdorf *et al.*, 1995; Chambon, 1996). These receptors belong to the steroid/thyroid hormone nuclear receptor superfamily and function as transcription factors by binding to retinoid response elements in the promoter of target genes, predominantly in the form of RAR/RXR heterodimers (Mangelsdorf and Evans, 1995; Kastner *et al.*, 1997).

Although retinoid signalling is known to play a crucial role during normal development of the central nervous system (Ross *et al.*, 2000), recent evidence suggests that retinoids also play an important role in the maintenance of mature nervous function (Malik *et al.*, 2000). Indeed, it has been shown that retinoic acid is present at relatively high levels in the adult brain (Connor and Sidell, 1997; Werner and De Luca, 2002) and that the retinoid receptors and cytosolic-binding proteins (CRBP for retinal and CRABP for RA) are expressed in several region of the adult brain (Krezel *et al.*, 1999; Zetterström *et al.*, 1999). Moreover, transgenic mice lacking RA receptors (RAR $\beta$ /RXR $\gamma$ ) or vitamin A-deprived mice display hippocampal long-term potentiation (LTP) impairment and memory deficit (Chiang *et al.*, 1998; Etchamendy *et al.*, 2003). All together, these data strongly suggest an involvement of brain retinoid signalling in higher cognitive function.

Thyroid hormones are also essential for normal function of foetal and adult central nervous system (Smith *et al.*, 2002). The thyroid hormone signalling pathway is mediated by nuclear receptors: the thyroid hormone receptors (TR $\alpha$ 1/ $\alpha$ 2/ $\beta$ ) whose ligand is the

triiodothyronine (T3). These nuclear receptors are part of the same superfamily as retinoid receptors and, at the nuclear level, both the thyroid hormone and retinoid signalling pathways interfere by binding to the RXR, which is the common activator of this superfamily (Chin and Yen, 1997).

Among the several neuronal genes regulated by the retinoid and/or the thyroid hormone receptors, there are those of the neurogranin (RC3) and the neuromodulin (GAP-43). These Ca<sup>2+</sup>-sensitive calmodulin-binding proteins play a critical role in synaptic plasticity and spatial learning (Gerendasy and Sutcliffe, 1997; Pak *et al.*, 2000; Routtenberg *et al.*, 2000). The expression of RC3 is regulated by RA (Iñiguez *et al.*, 1994; Enderlin *et al.*, 1997a), and by thyroid hormone (Iñiguez *et al.*, 1993; Guadaño-Ferraz *et al.*, 1997). GAP-43 is also regulated at a transcriptional level by RA (Grummer and Zachman, 2000; Husson *et al.*, 2004).

It has previously been shown in mice that aging is associated with reduced expression of brain RA and T3 nuclear receptors (RAR, RXR, TR) (Enderlin *et al.*, 1997a). Simultaneously, an age-related decrease in the target gene RC3 in the mouse hippocampus, associated with an impaired LTP and specific memory deficit (Etchamendy *et al.*, 2001) has been observed. Administration of retinoic acid to aged mice reversed the decrease in brain nuclear receptors and alleviated the age-related memory deficit (Etchamendy *et al.*, 2001). These dysregulations of retinoid/thyroid signalling pathways have been pointed out as potential causes of age-related cognitive impairment.

In this context, it is of primary interest to note that ethanol may interfere with retinoic acid (Boerman and Napoli, 1996) and triiodothyronine (Baumgartner *et al.*, 1997) biosynthesis pathways leading to a modification of the amount or the bioavailability of these nuclear receptor ligands. Therefore, it has been shown that chronic ethanol consumption in young mice induces a strong activation of the RA and T3 nuclear receptors associated with an increase in tissue transglutaminase (tTG) expression (Alfos *et al.*, 1996; Alfos *et al.*, 2001). The RAR target gene, tTG, is considered to be a good indicator of retinoic acid action (Verma *et al.*, 1992). More recently, it has been shown that ethanol consumption (12 % v/v for 5 months) reduced a selective age-associated memory deficit in mice (Krazem *et al.*, 2003a).

According to these data, it may be hypothesis that ethanol consumption in mice improves the age-associated memory decline by reversing the age-related decrease in brain RA and T3 nuclear receptors and associated target genes. To further assess this hypothesis, the present study was designed to investigate the effect of 5-month ethanol consumption on C57Bl/6 adult and aged mice (as previously used in the behavioural study) on retinoic acid and triiodothyronine nuclear receptors and on some of their target genes involved in synaptic

plasticity and learning. The relative mRNA level of RAR, RXR, TR and their target genes RC3 and GAP-43 in mice brain were measured using a real-time PCR method. The change in RC3 and GAP-43 protein levels was also investigated using Western blot analysis and the enzymatic activity of tissue transglutaminase was assayed in mouse brain.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### ***2.1. Animals***

The study was conducted in accordance with the European Communities Council Directives of 24 November, 1986. Subjects were pathogen-free male mice of the C57Bl/6 strain from Charles-River Laboratories (Lyon, France). Forty mice of two age ranges were selected for this study: 6 months old (adult) and 17 months old (aged). These animals were maintained on an automatic 12/12-hr light/dark cycle in a temperature-controlled room ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ). The animals were housed in collective cages.

### ***2.2. Alcohol administration***

Animals of each age-group were randomly assigned to one of the following experimental groups: ethanol (n = 10) and pair-fed (n = 10). As their only source of fluid, mice of the ethanol-treated groups were given a solution of ethanol 12% (v/v) for 5 months according to a previously described procedure (Alfos *et al.*, 2001; Krazem *et al.*, 2003a). The ethanol solution was a mixture of 95% ethanol and saccharose (30 g/l) and was freely available to subjects in two 250-ml bottles in each cage. The control groups were pair-fed mice, given an isocaloric solution of dextri-maltose. Dry food (Extra-Labo, Pietrement, France) was freely available throughout the experiment.

After 5 months of ethanol consumption, the adult mice (11 month-old) and the aged mice (22 month-old) were sacrificed by decapitation, and the brains were rapidly removed and stored at  $-80^\circ\text{C}$  for subsequent analysis.

### ***2.3. Quantification of mRNA***

Extraction of brain RNA was performed using the total RNA isolation system, RNAagents® (Promega Z5111, USA), according to the procedure recommended by the manufacturer.

#### ***Reverse transcription***

The cDNA was synthesized with Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) according to the protocol recommended by the manufacturer with minor modifications. Briefly, 1  $\mu\text{g}$  total RNA was incubated at  $70^\circ\text{C}$  for 10 min and then placed on ice before addition of reverse transcriptase reaction reagents with a specific reverse primer (120

ng) in a final volume of 20  $\mu$ l. The reverse transcriptase reaction was performed at 42° C for 60 min. Parallel reactions for each RNA sample were run in the absence of reverse transcriptase to assess the degree of any contaminating genomic DNA.

### ***Analysis of gene expression using real-time polymerase chain reaction***

The cDNA quantification by real-time PCR was performed as described previously (Husson *et al.*, 2003) using a LightCycler system (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). To detect target-gene amplification products, LightCycler DNA Master SYBR Green I was used according to the manufacturer's instructions. The PCR reactions were performed in microcapillary tubes in a final volume of 20  $\mu$ l containing 1X LC-DNA Master SYBR Green I mix, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5  $\mu$ M of each primer and 2  $\mu$ l cDNA. The amplification conditions were 95°C for 10 min to activate the polymerase, followed by forty cycles of denaturation at 95°C for 6 s, annealing at about 60°C (according to the gene studied) for 6 s, and elongation at 72°C for 10 s. After each elongation phase the fluorescence of SYBR Green I (a double-stranded DNA-binding dye) was measured and increasing amounts of PCR products were monitored from cycle to cycle. The forward and reverse primers for GAPDH (housekeeping gene), RAR $\beta$ , RAR $\alpha$ , RXR $\beta/\gamma$ , TR $\alpha/\beta$  and RC3 were the same as those previously used (Alfos *et al.*, 1996; Alfos *et al.*, 2001; Husson *et al.*, 2003). The forward and reverse primer sequences for GAP-43 were 5'-GTG ATG CAC CAG CTG CTG AGG-3' (nt 313-333) and 5'-GGG GAG TTA TCA GTG GTA GC-3' (nt 571-552) (Hulo *et al.*, 2002). Primers were purchased from Genset (Paris, France). For each primer pair used, melting curve analysis showed a single melting peak after amplification, indicating a specific product. Quantification data were analysed using the LightCycler analysis software, version 3.5 (Roche Diagnostics). In this analysis, the background fluorescence was removed by setting a noise band. The log-linear portion of the standard amplification curve was identified and the crossing point was the intersection of the best-fit line through the log-linear region and the noise band. The standard curve was a plot of the crossing point versus the amount of initial cDNA used for amplification. Standard curves were generated from 4-fold serial dilutions of target and housekeeping (glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase; GAPDH) cDNA preparation. The relationship between the crossing point and the initial amount of cDNA was found to be linear. The correlation coefficient (r) was 1 and PCR amplification efficiencies of the target and the housekeeping gene were similar and close to 100 %. These standard curves were used to estimate the concentration of both the target and the GAPDH gene in each sample. Then, the results were normalized by the ratio of

the relative concentration of target to that of GAPDH in the same sample. The real-time PCR method ensured that the expression level of GAPDH was unaffected by aging or ethanol treatment.

#### **2.4. GAP-43 and RC3 Western blot analysis**

Western blot analysis was performed according to the procedure of Watson *et al.* (1990) with minor modifications as previously described by Mons *et al.* (2001). Brain tissue from either ethanol mice (5 animals) or pair-fed mice (5 animals) of the two age groups was homogenized in 0.16 M NaCl, 11 mM sodium phosphate, pH 7.4 and 1 mM PMSF. The homogenate was centrifuged at 10 000 g. A sample of the supernatant fraction was removed for protein assay. Then SDS and dithiothreitol were added to a final concentration of 1 % (w/v) and 50 mM, respectively. Proteins were separated electrophoretically by size in a 12 % (w/v) denaturing SDS-polyacrylamide gel and transferred to a nitrocellulose membrane by electroblotting. The membrane was pre-blocked with 5 % non-fat milk in PBS-Tween 20 buffer (145 mM NaCl, 1.5 mM monohydrate sodium phosphate, 8 mM anhydrous sodium phosphate and 1 % Tween 20), incubated overnight with either polyclonal rabbit anti-neurogranin antibodies (diluted 1:3000, Affiniti Research, Exeter, UK) or polyclonal rabbit anti-GAP-43 antibodies (diluted 1:4000, Affiniti Research) or monoclonal mouse anti- $\beta$ -actin antibodies (1:8000; Sigma, St Louis, MO, USA), and washed briefly with PBS-Tween 20 buffer. Immunoreactive polypeptide bands were visualized by alkaline phosphatase-conjugated anti-rabbit (Sigma) or anti-mouse immunoglobulin G (Amersham, Orsay, France). Quantitation of detected bands was performed with the Quantity One analysis software (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). The relative levels of neurogranin (RC3) and neuromodulin (GAP-43) proteins were determined as a percentage of the same proteins in control mice. The constancy of the intensity of  $\beta$ -actin was verified in the present experimental conditions, in order to determine whether the changes in RC3 and GAP-43 protein levels were associated with generalized effect of aging or ethanol consumption.

#### **2.5. Assay for tissue transglutaminase activity**

Brain homogenates for the tTG assay were prepared as previously described by Alfos *et al.* (1996). Tissue transglutaminase-specific activity was measured by detecting the incorporation of [<sup>3</sup>H]putrescine into N,N'-dimethylcasein according to the method of Piacentini *et al.* (1986).

## ***2.6. 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.

### **3. RESULTS**

#### ***3.1. Nutritional and alcohol intake***

The average amount of alcohol intake during the five-month period in the two age groups did not differ significantly and was 13.3 g per kg body weight per day. This amount of ethanol consumed corresponds to about 20% of total calories ingested in adult and aged mice. No difference in total caloric intake was observed between the ethanol and pair-fed mice of the two age groups. At the end of the 5-month period, mice of both ethanol groups exhibited no significant difference in body weight as compared to their age-matched control group.

#### ***3.2. Effect of aging and ethanol consumption on brain $RAR\alpha$ , $RAR\beta$ , $RXR\beta\gamma$ and $TR\alpha\beta$ mRNA expression levels***

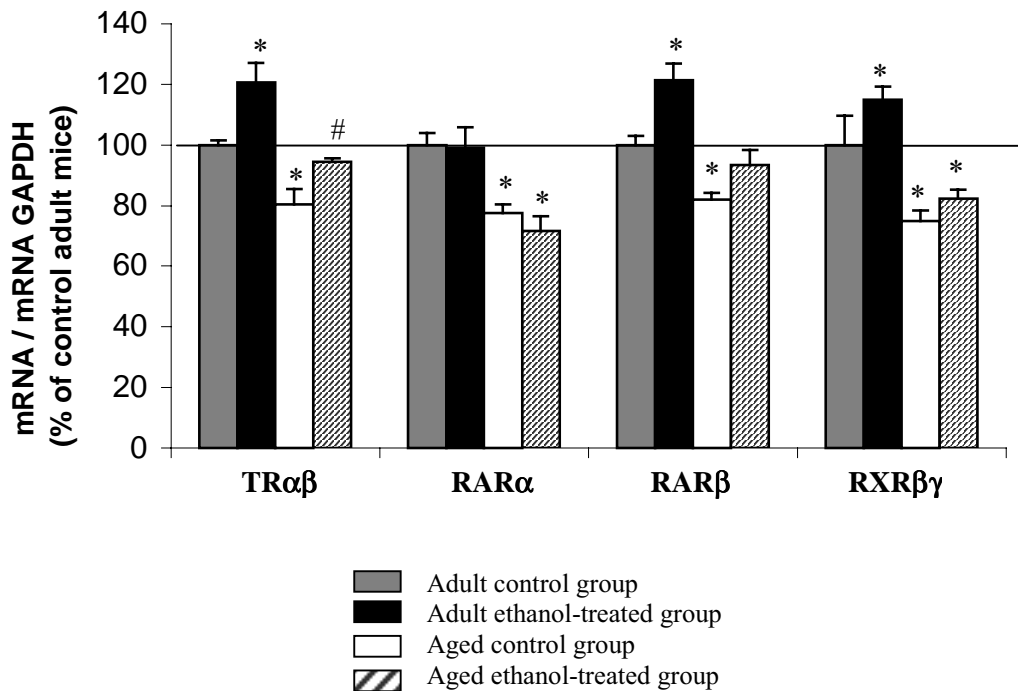
Concerning the effect of aging on the expression level of brain nuclear receptors, the results summarized in **Figure 1**, show that the amounts of  $TR\alpha\beta$ ,  $RAR\alpha$ ,  $RAR\beta$ , and  $RXR\beta\gamma$  mRNA were lower in the brain of 22 month-old control mice than in the brain of 11 month-old mice (-19%,  $p<0.01$ ; -22%,  $p<0.01$ ; -18%,  $p<0.01$  and -25%,  $p<0.01$ , respectively).

Concerning the effect of ethanol, as shown in **Figure 1**, adult mice submitted to 5 months of ethanol consumption displayed a significant increase in brain  $TR\alpha\beta$  mRNA (+20%,  $p<0.01$ ),  $RAR\beta$  mRNA (+23%,  $p<0.01$ ) and  $RXR\beta\gamma$  mRNA (+15%,  $p<0.05$ ) versus the adult control group.

Aged mice submitted to the same ethanol consumption displayed only a significant increase in brain  $TR\alpha\beta$  (+17%,  $p<0.05$ ) and a slight but not significant increase in  $RAR\beta$  mRNA (+12%,  $p<0.07$ ) versus the aged control group (**Fig. 1**). However, ethanol consumption in aged mice resulted in a statistically significant overall normalization of  $TR\alpha\beta$  and  $RAR\beta$  mRNA contents back to levels observed in adult mouse brains (**Fig. 1**). Ethanol consumption produced no statistically significant effect on  $RXR\beta\gamma$  mRNA levels in aged mice as compared with adult or aged control mice.

Moreover, ethanol consumption did not induce any modification of  $RAR\alpha$  mRNA levels in the brain of adult nor aged mice (Fig. 1).





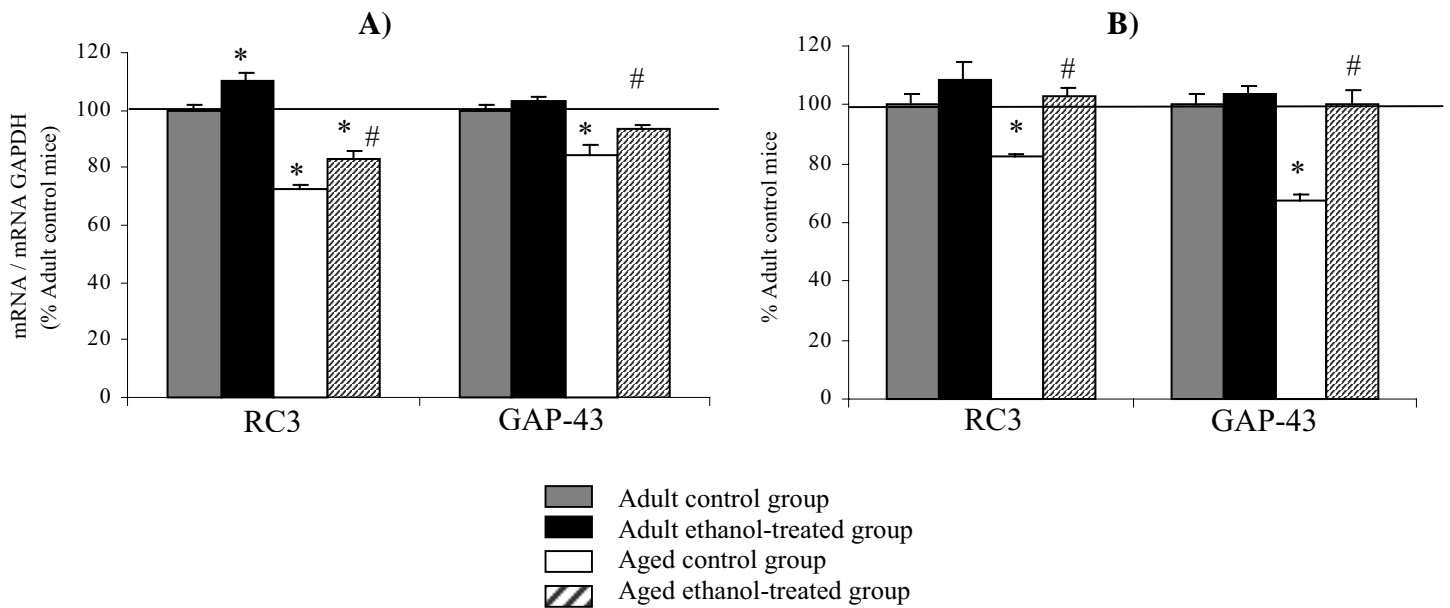
**Figure 1: Effect of ethanol consumption on the mRNA level of T3 and RA nuclear receptors in the brain of adult (11 months) and aged (22 months) mice.**

Data bars represent mean  $\pm$  SEM of duplicate measures performed on five animals (n=5). *Post hoc* Fisher tests: \*  $p < 0.05$  significantly different from adult control mice and #  $p < 0.05$  significantly different from aged control mice.

### ***3.3. Effect of aging and ethanol consumption on RC3 and GAP-43 mRNA and protein levels***

The present results showed an age-related significant decrease in RC3 mRNA (**Fig. 2A**)(-27%,  $p < 0.01$ ) and in GAP-43 mRNA (-16%,  $p < 0.01$ ) compared to adult mice. Densitometric analyses of protein immuno-reactivity (IR) revealed that RC3-IR (detected as a single band migrating at 15 kDa) and GAP-43-IR (detected as a single band migrating around 40 and 45 kDa) were significantly reduced in aged mice as compared to adult mice (-18%,  $p < 0.01$  and -32%,  $p < 0.01$ , respectively) (**Fig. 2B**). **Figure 3** shows a typical Western blot for GAP-43 in the brain of the four mouse groups. Immunoblots of young and aged homogenized brains with  $\beta$ -actin antibodies revealed no age-related differences between groups (**Fig. 3C**).

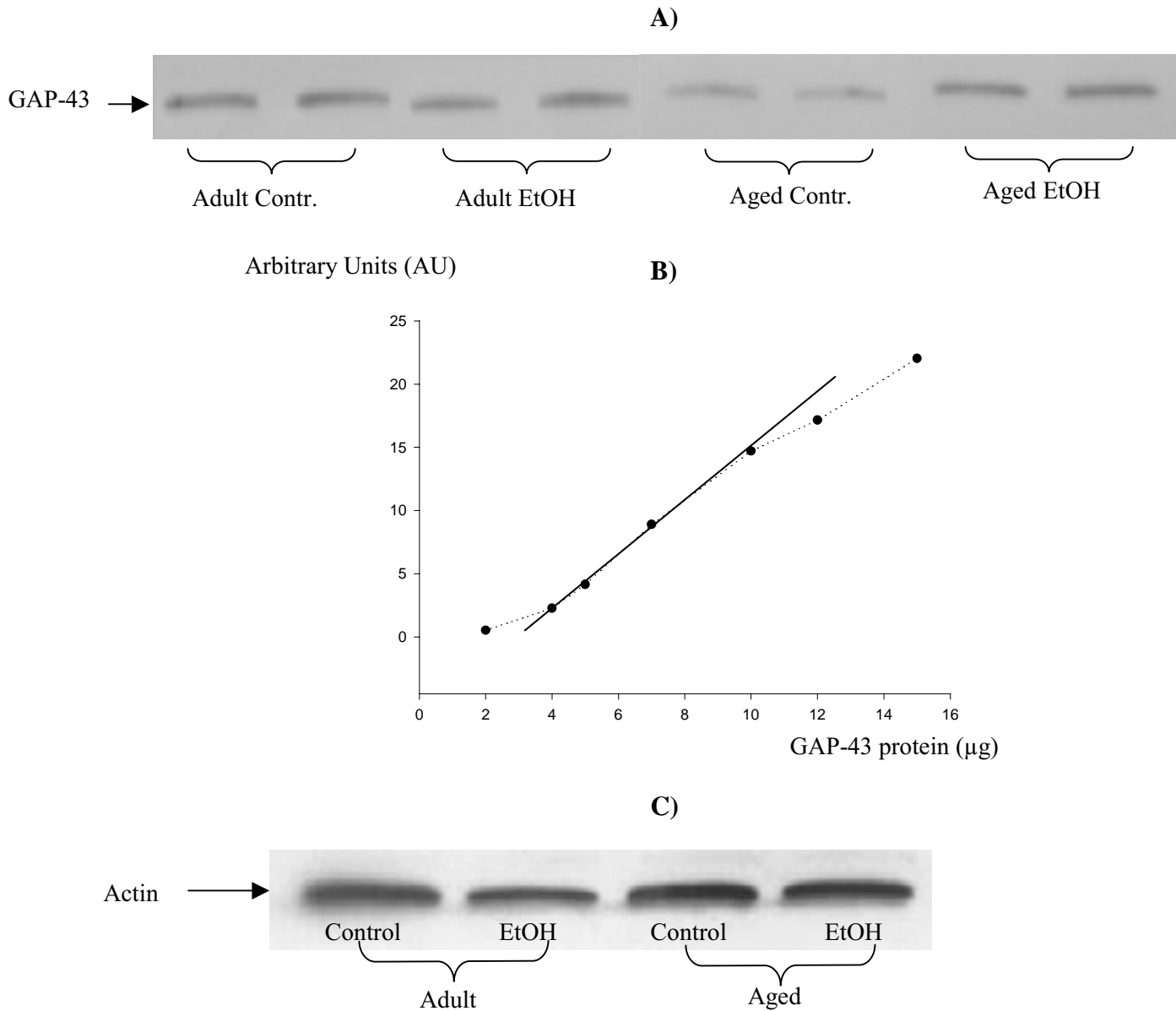
Concerning the effect of ethanol, as shown in **Figure 2**, adult mice submitted to ethanol consumption for 5 months displayed a slight but significant increase in RC3 mRNA levels in the brain (+10%,  $p < 0.05$ ) without any statistically significant change of RC3 protein levels. Ethanol consumption did not produce any change of GAP-43 mRNA or protein level in the brain of adult mice as compared to control mice.



**Figure 2: Effect of ethanol consumption on the expression of RC3 and GAP-43 mRNA (A) and protein (B) in the brain of adult (11 months) and aged (22 months) mice.**

Data bars represent mean  $\pm$  SEM of duplicate measures performed on five animals ( $n=5$ ). *Post hoc* Fisher tests: \*  $p < 0.05$  significantly different from adult control mice and #  $p < 0.05$  significantly different from aged control mice.

Ethanol consumption in aged mice induced a significant increase in RC3 mRNA levels (+14%,  $p < 0.03$ ) and a slight statistically significant increase of GAP-43 mRNA level (+11%,  $p < 0.05$ ) (**Fig. 2A**). At the protein level (**Fig. 2B**), ethanol consumption in aged mice produced a significant increase in both RC3 and GAP-43 amounts (+25%,  $p < 0.01$  and +48%,  $p < 0.01$ , respectively) which restored both protein levels to that of adult mice. Immunoblots of young and aged brains with  $\beta$ -actin antibodies revealed no ethanol induced differences between groups (**Fig. 3C**).



**Figure 3:** (A) A representative Western blot of GAP-43 in 11 month-old pair-fed (Adult Contr.), 11 month-old ethanol treated (Adult EtOH), 22 month-old pair-fed (Aged Contr.) and 22 month-old ethanol treated (Aged EtOH) mice. (B) Densitometric analysis of GAP-43 showed linear responses between 4 and 10  $\mu\text{g}$  of total protein loaded. (C) A representative Western blot of  $\beta$ -actin in the same mice. Densitometric quantification of band intensities corresponding to  $\beta$ -actin showed no difference in old mice in comparison with adults, and in pair-fed mice as compared with ethanol treated mice.

### 3.4. Effect of aging and ethanol consumption on brain tTG activity

As shown in **Table 1**, an aged-related decrease in tissue transglutaminase (tTG) specific activity (-38%,  $p < 0.05$ , versus adult control group) in the brain of mice was observed.

Ethanol induced a significant increase in brain tTG activity in adult mice (+19%,  $p < 0.05$ ) and a non-statistically significant increase in this enzymatic activity in aged mouse brains (+17%,  $p < 0.12$ ) compared to adult pair-fed mice (**Table 1**).

**Table 1: Effect of ethanol consumption on tissue transglutaminase specific activity in the brain of adult and aged mice.**

	tTG activity (pmol <sup>3</sup> H putrescine/h per mg protein)
Adult control mice	1.19 ± 0.04
Adult ethanol-treated mice	1.42 ± 0.05 *
Aged control mice	0.74 ± 0.06 *
Aged ethanol-treated mice	0.87 ± 0.05 *

Mean ± SEM of duplicate measures performed on five animals (n=5). *Post hoc* Fisher test: \*  $p < 0.05$  significantly different from adult control mice.

## **4. DISCUSSION**

### ***4.1. Effect of aging on RA and T3 nuclear receptors and target genes***

The decrease in nuclear receptor (RAR $\alpha$ , RAR $\beta$ , RXR $\beta$  $\gamma$  and TR $\alpha$  $\beta$ ) mRNA levels in the brains of aged mice (22 months) compared to adult mice (11 months) confirm previous data obtained in mice (Enderlin *et al.*, 1997a; Etchamendy *et al.*, 2001) and rats (Enderlin *et al.*, 1997b). It is well known that RA and T3 induce a positive regulation of the amount of their nuclear receptors in several organs including the brain (Kato *et al.*, 1992; Lebel *et al.*, 1993; Yamagata *et al.*, 1993; Husson *et al.*, 2003). Taken together these data suggest that the age-related decrease in brain RA and T3 nuclear receptor expression may result from a reduction of RA and T3 bioavailability at a nuclear level.

The effect of aging on some retinoid and thyroid hormone target genes was also studied. First, in the aged mouse brain, a decrease was observed in tissue transglutaminase enzymatic activity with respect to adult mice. This result is in agreement with a previous study (Enderlin *et al.*, 1997a) and should be compared to the decrease in RA receptors, as it is now well established that retinoid status influences tTG expression in several organs including the brain (Verma *et al.*, 1992), because of a retinoic acid response element located in the promoter of this gene (Nagy *et al.*, 1996). The present data also showed an age-related decrease in mRNA and protein expression levels of RC3 and GAP-43. These results are coherent with previous studies (Casoli *et al.*, 2001, Etchamendy *et al.*, 2001, Mons *et al.*, 2001). Several studies have reported the regulation of RC3 and GAP-43 expression by RA and thyroid hormone (Iñiguez *et al.*, 1993; Iñiguez *et al.*, 1994; Enderlin *et al.*, 1997a; Guadaño-Ferraz *et al.*, 1997; Grummer and Zachman, 2000; Husson *et al.*, 2004). Thus, both the present and prior results suggest that aging induces RA and T3 receptors hypo-expression that could be responsible, at least in part, for the down-regulation of target genes, such as RC3 and GAP-43, implicated in learning and synaptic plasticity. Retinoid and thyroid hormone signalling pathways seem to play important roles in the adult CNS, and their altered regulation has been pointed out as a potential cause of age-related cognitive impairment (Etchamendy *et al.*, 2001; Etchamendy *et al.*, 2003).

#### ***4.2. Effect of ethanol consumption on RA and T3 nuclear receptors and target genes***

The originality of the present investigation was to study the effects of ethanol consumption, according to the age of the animals, on RA and T3 signalling pathways. The results show that adult mice submitted to 5-month ethanol consumption displayed an increase in brain mRNA levels of the nuclear receptors TR $\alpha$  $\beta$ , RAR $\beta$  and RXR $\beta$  $\gamma$ . These results are in agreement with previous studies showing an overexpression of these nuclear receptors in the brain of adult ethanol-treated mice (Alfos *et al.*, 1996; Alfos *et al.*, 2001). Moreover, in accordance with previous studies (Grummer and Zachman, 2000; Alfos *et al.*, 2001) the present data show that the expression of RAR $\alpha$  mRNA was unaffected by ethanol consumption whatever the age of the mice. Here, for the first time it was shown that ethanol consumption in aged mice induced an increase in brain RAR $\beta$  and TR $\alpha$  $\beta$  mRNA levels and restored the expression of these nuclear receptors back to that of adult mice. The ethanol-induced increased level in RAR $\beta$  and TR $\alpha$  $\beta$  mRNA in aged mouse brain may be the result of an increased bioavailability of their ligands, RA and T3, because the up-regulation of these nuclear receptors by their own ligands is now well established (Kato *et al.*, 1992; Lebel *et al.*, 1993; Yamagata *et al.*, 1993). This hypothesis is supported by other reports showing (i) that enzymes involved in retinoic acid synthesis pathways are stimulated by ethanol (Boerman and Napoli, 1996), (ii) an increase in brain RA synthesis in ethanol-treated rats (Ullman *et al.*, 1998), (iii) and an ethanol-induced mobilization of retinol from the liver to other organs as, for example, the brain (Frank *et al.*, 1976). Moreover, concerning the effects of ethanol on thyroid hormone metabolic pathways, an ethanol-induced stimulation of type II iodothyronine 5'deiodinase, the enzyme catalysing the deiodination of thyroxin (T4) to the 'metabolically active' T3 has been demonstrated in the brain (Baumgartner *et al.*, 1994; Baumgartner *et al.*, 1997).

The effects of ethanol consumption on RA and T3 target genes were also studied, according to the age of the animals. First, the data showed that ethanol consumption induced a significant increase in tTG enzymatic activity in the adult mouse brain as compared to pair-fed animals, but this increase was no longer significant in aged mouse brains. This effect of ethanol on tTG expression has already been reported in rodents (Alfos *et al.*, 1996; Sessa *et al.*, 1997; Alfos *et al.*, 2001) and is in agreement with the RAR $\beta$  and RXR $\beta$  $\gamma$  ethanol-induced overexpression observed in adult mouse brains. These results support the hypothesis of an increased RA content in ethanol-treated mouse brains. In order to investigate the combined effects of ethanol consumption and aging on synaptic plasticity, the mRNA and protein levels

of neuron specific RA and T3 nuclear receptors target genes, RC3 and GAP-43, were examined. Concerning RC3, the data showed a slight increase in RC3 mRNA level and no statistically significant modification in RC3 protein levels in the adult mouse brain submitted to ethanol consumption. On the other hand, a significant increase in RC3 mRNA level and a reversal of the age-related decline of RC3 protein level in ethanol-treated aged mice, as compared with pair-fed ones was observed. These results are in agreement with those of Krazem *et al.* (2003b). They showed, using an *in situ* hybridization method, that the same alcohol treatment (ethanol 12% for 5 months) induces an overall normalization of the age-related decrease in neurogranin transcripts back to levels observed in pair-fed adult groups, in the CA1, CA3 subfields and the dentate gyrus of the dorsal hippocampus. Together these results are in accordance with the normalization of brain TR $\alpha$  $\beta$  mRNA level in alcohol-treated aged mice back to that of adult mice. Concerning GAP-43, as for RC3, different effects of ethanol on the expression of this calmodulin-binding protein were observed according to the age of the animals. Whereas in adult mouse brains the GAP-43 mRNA and protein levels were unaffected by ethanol consumption, in the brain of ethanol-treated aged mice, a slight but not significant increase in GAP-43 mRNA level and a strong increase in GAP-43 protein level were observed, which reversed the age-related decline of this synaptic protein. These results are in agreement with those of Casoli *et al.* (2001) showing no effect of ethanol consumption on the level of GAP-43 protein in the hippocampus of adult rats and an alleviation of the age-associated decrease of this protein in the hippocampus of ethanol-treated aged rat.

#### ***4.3. Effect of ethanol consumption on synaptic plasticity process in aged mice: possible involvement of RA and T3 signalling pathways***

RC3 and GAP-43 are postsynaptic and presynaptic Ca<sup>2+</sup>-sensitive calmodulin-binding proteins, involved in spatial learning and in hippocampal long-term potentiation (Gerendasy and Sutcliffe, 1997; Pak *et al.*, 2000; Routtenberg *et al.*, 2000), the most widely studied form of synaptic plasticity thought to underlie information storage (McNaughton and Morris, 1987). In their study, Casoli *et al.* (2001) suggested that the increase in GAP-43 levels in the hippocampus of ethanol-treated aged rats is a compensatory response of the detrimental effect induced by ethanol and may result from a toxic effect of ethanol on neuronal membrane proteins. Several mechanisms could be involved in the effect of ethanol on RC3 and GAP-43 expression and protein levels. However, the present results showing an increase in GAP-43 and RC3 expression associated with a normalization of the TR $\alpha$  $\beta$  and RAR $\beta$  mRNA level in

ethanol-treated aged mouse brains suggest that the effect of ethanol on synaptic plasticity proteins could be mediated, at least in part, by the RA and T3 signalling pathways. This hypothesis is in agreement with data suggesting an involvement of these signalling pathways in synaptic plasticity and memory process. In fact, recent studies using knock-out or vitamin A-deficient animals strongly suggest a major role of brain retinoid signalling in higher cognitive function (Chiang *et al.*, 1998; Misner *et al.*, 2001, Etchamendy *et al.*, 2003). Furthermore, thyroid hormones are also essential for the adult central nervous system function and hypothyroidism has been associated with memory impairment (Smith *et al.*, 2002). These signalling pathways are involved in the regulation of several genes supporting the functional synaptic properties required for memory processing such as RC3 and GAP-43 studied here (Gerendasy and Sutcliffe, 1997; Grummer and Zachman, 2000) but also NMDA receptors (Lee *et al.*, 2003) or neurotrophic factors and cholinergic-specific proteins (Malik *et al.*, 2000). Moreover, these results should be compared with those of Etchamendy *et al.* (2001) showing that acute RA administration in aged mice restored RA receptors and RC3 expression level in the brain back to that of adult mice and suppressed an age-related memory deficit. All together, the present data and the literature concerning the essential role of RA and T3 in the functioning of the adult central nervous system suggest that the increase in RA and T3 nuclear receptors in ethanol-treated aged-mice re-establishes a sufficient level of expression of target genes involved in synaptic plasticity which may be responsible for the alleviation of the age-related cognitive deficit previously observed (Krazem *et al.*, 2003a).

In conclusion, the originality of our study was to link the previously observed behavioural effect of ethanol in aged mice with modification in the expression of RA and T3 nuclear receptors and target genes involved in synaptic plasticity. Compared with previous behavioural data, these results suggest that the ethanol-induced increase in RA and T3 nuclear receptors by ethanol could be one of the mechanisms involved in the normalization of synaptic plasticity-associated target gene levels altered in aging brains, which leads to a partial suppression of a selective age-related cognitive deficit. These results strongly suggest that a fine regulation of retinoid and thyroid hormone mediated gene expression is essential for optimal brain functioning and that a dysregulation of these signalling pathways is a potential etiological factor for memory deficit during aging. Additional studies are under way to investigate the effects of ethanol consumption and aging on regional RA and T3 nuclear receptors and target gene expression profiles in mouse brain.



## ***ACKNOWLEDGMENTS***

This research was supported by the Institut de Recherches Scientifiques sur les Boissons (IREB, Paris) and the Conseil Régional d'Aquitaine. The authors thank K. Mayo for English revision.

## References

- Alfos, S., Higuieret, P., Pallet, V., Higuieret, D., Garcin, H., Jaffard, R., 1996. Chronic ethanol consumption increases the amount of mRNA for retinoic acid and triiodothyronine receptors in mouse brain. *Neurosci. Lett.* 206, 73-76.
- Alfos, S., Boucheron, C., Pallet, V., Higuieret, D., Enderlin, V., Beracochea, D., Jaffard, R., Higuieret, 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, 1506-1514.
- Baumgartner, A., Heyne, A., Campos-Barros, A., Kohler, R., Muller, F., Meinhold, H., Rommelspacher, H., Wolffgramm, J., 1994. Hypothalamic-pituitary-thyroid axis in chronic alcoholism. II. Deiodinase activities and thyroid hormone concentrations in brain and peripheral tissues of rats chronically exposed to ethanol. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 18, 295-304.
- Baumgartner, A., Eravci, M., Pinna, G., Hiedra, L., Prengel, H., Brodel, O., Meinhold, H., 1997. Thyroid hormone metabolism in the rat brain in an animal model of 'behavioral dependence' on ethanol. *Neurosci. Lett.* 227., 25-28.
- Boerman, M.H., Napoli, J.L., 1996. Cellular retinol-binding protein-supported retinoic acid synthesis. Relative roles of microsomes and cytosol. *J. Biol. Chem.* 271, 5610-5616.
- Casoli, T., Di Stefano, G., Gracciotti, N., Fattoretti, P., Solazzi, M., Bertoni-Freddari, C., 2001. Age-related effects of moderate alcohol consumption on GAP-43 levels in rat hippocampus. *Mech. Ageing Dev.* 122, 1723-1738.
- Chambon, P., 1996. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J.* 10, 940-954.
- Chiang, M.Y., Misner, D., Kempermann, G., Schikorski, T., Giguère, V., Sucov, H.M., Gage, F.H., Stevens, C.F., Evans, R.M., 1998. An essential role for retinoid receptors RAR $\beta$  and RXR $\gamma$  in long-term potentiation and depression. *Neuron* 21, 1353-1361.
- Chin, W.W., Yen, P.M., 1997. Molecular mechanisms of nuclear thyroid hormone action. In: Braverman, L.E., (editor). *Diseases of The Thyroid*. Humana Press, Totowa, pp 1–15
- Connor, M.J., Sidell, N., 1997. Retinoic acid synthesis in normal and Alzheimer diseased brain and human neural cells. *Mol. Chem. Neuropathol.* 30, 239-252.
- Coustaut, M., Pallet, V., Garcin, H., Higuieret, P., 1996. The influence of dietary vitamin A on triiodothyronine, retinoic acid, and glucocorticoid receptors in liver of hypothyroid rats. *Br. J. Nutr.* 76, 295-306.
- Dauncey, M.J., White, P., Burton, K.A., Katsumata, M., 2001. Nutrition-hormone receptor-gene interactions: implications for development and disease. *Proc. Nutr. Soc.* 60, 63-72.

- Enderlin, V., Pallet, V., Alfos, S., Dargelos, E., Jaffard, R., Garcin, H., Higuieret, P., 1997a. Age-related decreases in mRNA for brain nuclear receptors and target genes are reversed by retinoic acid treatment. *Neurosci. Lett.* 229, 125-129.
- Enderlin, V., Alfos, S., Pallet, V., Garcin, H., Azais-Braesco, V., Jaffard, R., Higuieret, P., 1997b. 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, 629-632.
- 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 signalling. *J. Neurosci.* 21, 6423-6429.
- 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, 37-49.
- Frank, O., Luisada-Opper, A., Sorrell, M.F., Zetterman, R., Baker, H., 1976. Effects of a single intoxicating dose of ethanol on the vitamin profile of organelles in rat liver and brain. *J. Nutr.* 106, 606-614.
- Gerendasy, D.D., Sutcliffe, J.G., 1997. RC3/neurogranin, a postsynaptic calpacitin for setting the response threshold to calcium influxes. *Mol. Neurobiol.* 15, 131-163.
- Grummer, M.A., Zachman, R.D., 2000. Interaction of ethanol with retinol and retinoic acid in RAR beta and GAP-43 expression. *Neurotoxicol. Teratol.* 22, 829-836.
- Guadaño-Ferraz, A., Escamez, M.J., Morte, B., Vargiu, P., Bernal, J., 1997. Transcriptional induction of RC3/neurogranin by thyroid hormone: differential neuronal sensitivity is not correlated with thyroid hormone receptor distribution in the brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 49, 37-44.
- Hulo, S., Alberi, S., Laux, T., Muller, D., Caroni, P., 2002. A point mutant of GAP-43 induces enhanced short-term and long-term hippocampal plasticity. *Eur. J. Neurosci.* 15, 1976-1982.
- 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, 191-198.
- 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. *Mol. Brain Res.* In press.
- Iñiguez, M.A., Rodriguez-Peña, A., Ibarrola, N., Aguilera, M., Muñoz, A., Bernal, J., 1993. Thyroid hormone regulation of RC3, a brain-specific gene encoding a protein kinase-C substrate. *Endocrinology* 133, 467-473.
- Iñiguez, M.A., Morte, B., Rodriguez-Peña, A., Muñoz, 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.

- Kastner, P., Mark, M., Ghyselinck, N., Krezel, W., Dupe, V., Grondona, J.M., Chambon, P., 1997. Genetic evidence that the retinoid signal is transduced by heterodimeric RXR/RAR functional units during mouse development. *Development* 124, 313-326.
- 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.* 286, 755-760.
- Krazem, A., Marighetto, A., Higuieret, P., Jaffard, R., 2003a. Age-dependent effects of moderate chronic ethanol administration on different forms of memory expression in mice. *Behav. Brain Res.* 147, 17-29.
- Krazem, A., Mons, N., Higuieret, P., Jaffard, R., 2003b. Chronic ethanol consumption restores the age-related decrease in neurogranin mRNA level in the hippocampus of mice. *Neurosci. Lett.* 338, 62-66.
- Krezel, W., Kastner, P., Chambon, P., 1999. Differential expression of retinoid receptors in the adult mouse central nervous system. *Neuroscience* 89, 1291-1300.
- Lebel, J.M., L'Herault, S., Dussault, J.H., Puymirat, J., 1993. Thyroid hormone up-regulates thyroid hormone receptor beta gene expression in rat cerebral hemisphere astrocyte cultures. *Glia* 9, 105-112.
- Lee, P.R., Brady, D., Koenig, J.I., 2003. Thyroid hormone regulation of N-Methyl-D-Aspartic Acid receptor subunit mRNA expression in adult brain. *J. Neuroendocrinol.* 15, 87-92.
- Malik, M.A., , Blusztajn, J.K., Greenwood, C.E., 2000. Nutrients as trophic factors in neurons and the central central nervous system: role of retinoic acid. *J. Nutr. Biochem.* 11, 2-13.
- Mangelsdorf, D.J., Evans, R.M., 1995. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 83, 841-850.
- Mangelsdorf, D.J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schutz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P., Evans, R.M., 1995. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83, 835-839.
- McNaughton, N., Morris, R.G., 1987. Hippocampal synaptic enhancement and information storage within a distributed memory system. *Trends Neurosci.* 10, 408-415.
- 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. USA* 98, 11714-11719.
- Mons, N., Enderlin, V., Jaffard, R., Higuieret, P., 2001. Selective age-related changes in the PKC-sensitive, calmodulin-binding protein, neurogranin, in the mouse brain. *J. Neurochem.* 79, 859-867.
- Nagy, L., Saydak, M., Shipley, N., Lu, S., Basilion, J.P., Yan, Z.H., Syka, P., Chandraratna, R.A., Stein, J.P., Heyman, R.A., Davies, P.J., 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, 4355-4365.

- Pak, J.H., Huang, F.L., Li, J., Balschun, D., Reymann, K.G., Chiang, C., Westphal, H., Huang, K.P., 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. USA* 97, 11232-11237.
- Piacentini, M., Sartori, C., Beninati, S., Bargagli, A.M., Ceru-Argento, M.P., 1986. Ornithine decarboxylase, transglutaminase, diamine oxidase and total diamines and polyamines in maternal liver and kidney throughout rat pregnancy. *Biochem. J.* 234, 435-440.
- Ross, S.A., McCaffery, P.J., Drager, U.C., De Luca, L.M., 2000. Retinoids in embryonal development. *Physiol. Rev.* 80, 1021-1054.
- Routtenberg, A., Cantalalops, I., Zaffuto, S., Serrano, P., Namgung, U., 2000. Enhanced learning after genetic overexpression of a brain growth protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 7657-7662.
- Sessa, A., Tunici, P., Rabellotti, E., Perin, A., 1997. Transglutaminase activity in rat brain after ethanol exposure. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 21, 1241-1245.
- Smith, J.W., Evans, A.T., Costall, B., Smythe, J.W., 2002. Thyroid hormones, brain function and cognition: a brief review. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 26, 45-60.
- Sporn, M.B., Roberts, A.B., Goodman, D.S., 1994. *The Retinoids: Biology, Chemistry, and Medicine*. 2nd ed. Raven Press, New York.
- Ullman, M.D., McCaffery, P., Evans, J., Koul, O., McCluer, R.H., 1998. Ethanol increases cerebellar and decreases cortical retinoic acid concentration of postnatal rat brain. (Abstract) *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 22, 55A.
- Verma, A.K., Shoemaker, A., Simsiman, R., Denning, M., Zachman, R.D., 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, 2144-2152.
- Watson, J.B., Battenberg E.F., Wong, K.K., Bloom, F.E., Sutcliffe, J.G., 1990. Subtractive cDNA cloning of RC3, a rodent cortex-enriched mRNA encoding a novel 78 residue protein. *J. Neurosci. Res.* 26, 397-408.
- Werner, E.A., Deluca, H.F., 2002. Retinoic acid is detected at relatively high levels in the CNS of adult rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 282, E672-678.
- Yamagata, T., Momoi, T., Kumagai, H., Nishikawa, T., Yanagisawa, M., Momoi, M., 1993. Distribution of retinoic acid receptor  $\beta$  proteins in rat brain: up-regulation by retinoic acid. *Biomed. Res.* 14, 183-190.
- 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.



## **CONCLUSION**

Les résultats de cette étude montrent que les animaux âgés soumis à une alcoolisation chronique présentent un niveau d'expression des récepteurs de la triiodothyronine ( $TR\alpha/\beta$ ) et de l'acide rétinoïque ( $RAR\beta$ ) comparable à celui mesuré chez les animaux adultes. L'activation des voies de signalisation de l'AR et de la T3 dans le cerveau des animaux âgés alcoolisés se traduit aussi au niveau de l'expression de deux gènes cibles RC3 et GAP-43. En effet, leur expression est plus élevée que celle mesurée chez des animaux âgés témoins.

Par ailleurs, dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire de Neurosciences Cognitives, les capacités de la mémoire relationnelle/déclarative, partiellement altérées avec l'âge (Marighetto et coll., 1999) ont été évaluées sur un labyrinthe radial (Krazem et coll., 2003a). Ainsi dans les conditions d'alcoolisation chronique mises en œuvre nos résultats montrent que les modifications des fonctions cognitives induites par l'éthanol dépendent de l'âge du sujet et produisent des effets «bi-directionnels» (i.e., une perturbation ou une facilitation). D'une façon générale, l'alcoolisation des animaux adultes (10-11 mois) conduit à une détérioration plus ou moins marquée des fonctions cognitives alors que la même alcoolisation a un effet inverse chez les animaux âgés (21-22 mois) où elle réduit les déficits cognitifs liés au vieillissement.

Confrontés aux résultats concernant l'action hormonale, ces données suggèrent que la «suractivation» des voies d'action de l'acide rétinoïque et de la triiodothyronine, chez des animaux adultes, puissent être à l'origine d'un dysfonctionnement, via certains gènes cibles anormalement exprimés, de la plasticité des synapses notamment hippocampiques. Par contre, l'hypofonctionnement de ces voies de signalisation chez des animaux âgés, en partie «normalisée» par l'alcoolisation, pourrait expliquer l'amélioration des dysfonctionnements cognitifs liés au vieillissement.

Cette hypothèse devait être validée et la suite du travail expérimental s'est inscrite dans cette démarche en adoptant des conditions d'alcoolisation plus modérées. Plus précisément, la question scientifique centrale est la suivante : les effets «bi-directionnels» (i.e. une perturbation chez le sujet adulte ou une facilitation chez le sujet âgé) persistent-ils dans des conditions plus modérées de consommation d'alcool ?





**CHAPITRE IV**  
**ETUDE DES EFFETS D'UNE CONSOMMATION MODEREE**  
**D'ALCOOL SUR L'ACTION CELLULAIRE DE L'ACIDE**  
**RETINOÏQUE ET DE LA TRIODOTHYRONINE AU COURS DU**  
**VIEILLISSEMENT CEREBRAL**



## **Chapitre IV**

### **ETUDE DES EFFETS D'UNE CONSOMMATION MODEREE D'ALCOOL<sup>1</sup> SUR L'ACTION CELLULAIRE DE L'ACIDE RETINOÏQUE ET DE LA TRIODOTHYRONINE AU COURS DU VIEILLISSEMENT CEREBRAL**

Nous avons précédemment mis en évidence des effets «bi-directionnels» d'une consommation chronique d'alcool (12%). Plus précisément nous avons observé, chez des animaux adultes alcoolisés, une augmentation de l'activité des voies de signalisation de l'acide rétinoïque et de la triiodothyronine et une altération concomitante des capacités cognitives. En revanche, les mêmes conditions d'alcoolisation chez des animaux âgés, se traduisent par une stimulation des voies de signalisation de l'AR et de la T3, déprimées avec l'âge, et par l'amélioration de certaines performances mnésiques.

Dans la suite de ce travail, nous avons cherché à savoir si les effets «bi-directionnels» d'une alcoolisation (12% (v/v) dans l'eau de boisson), traduits par des effets différents selon l'âge des animaux, persistaient dans des conditions d'alcoolisation plus modérées <sup>1</sup>.

Cette nouvelle étude, avait pour but de préciser les liens existant entre des dérégulations des voies de signalisation de l'AR et de la T3 et les altérations de la plasticité synaptique, en étudiant les gènes cibles dans différentes structures cérébrales, et particulièrement dans l'hippocampe, le striatum et le cortex. Il est en effet connu que ces trois régions, dans lesquelles GAP-43 et/ou RC3 sont fortement exprimés, jouent des rôles importants dans les processus mnésiques (Kandel et Pittenber, 1999 ; White et McDonald, 2002).

Dans cette étude, et dans le but d'établir des liens entre les données moléculaires et le résultats comportementaux, les animaux ont été soumis à des tests réalisés dans un labyrinthe radial, destinés à évaluer leur mémoire relationnelle (Marighetto et coll., 1999).

---

<sup>1</sup> Ethanol à 6% (volume/volume) apporté dans l'eau de boisson des animaux.

Les résultats de cette étude font l'objet de la publication 3.

### **Méthodologie utilisée**

Des souris mâles de la lignée C57Bl/6, adultes (7 mois) et âgées (17 mois), ont été soumises pendant 5 mois à une alcoolisation modérée (éthanol 6% (v/v)). Cette consommation d'alcool correspond à une valeur moyenne de 6 g/kg/jour et fournit environ 10% de l'apport calorique total <sup>2</sup>.

Dans ces conditions expérimentales, nous avons étudié le niveau d'activité des voies de l'AR et de la T3, dans le cerveau, tout d'abord en mesurant le niveau d'expression des ARNm de leurs récepteurs nucléaires, puis en quantifiant le niveau d'expression (ARNm et protéines) de deux de leurs gènes cibles : la neuromoduline (GAP-43) et la neurogranine (RC3). Les niveaux d'expression de RC3 et de GAP-43 ont été mesurés dans le cerveau entier, mais aussi dans différentes structures cérébrales : hippocampe, striatum et cortex.

Par ailleurs, dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire de Neurosciences Cognitives, tous les animaux ont été soumis, dans un labyrinthe radial, à des épreuves comportementales destinées à éprouver leurs performances mnésiques (Marighetto et coll., 1999).

---

<sup>2</sup> Cet apport calorique, correspondant environ à une consommation de 3 verres par jour pour un homme (soit environ 30 g d'alcool), et de 2-2,5 verres par jour pour une femme (soit 20 à 25g d'alcool), se rapproche des doses considérées comme modérées par les experts en santé publique (revue dans Paille, 2002).

## **Principaux résultats**

### **Etudes comportementales**

Les résultats des études comportementales, effectuées dans le laboratoire de Neurosciences Cognitives, ont mis en évidence la suppression d'un déficit de la mémoire relationnelle chez les souris âgées soumises à une consommation modérée d'alcool. Dans ces conditions d'alcoolisation modérée les souris adultes ne présentent pas d'altération de ce type de mémoire.

### **Etudes biochimiques**

#### **Expression des récepteurs nucléaires de l'AR et de la T3**

En accord avec les résultats déjà obtenus au laboratoire, nous avons observé une hypoexpression des ARNm des récepteurs nucléaires de l'AR et de la T3 dans le cerveau des souris âgées par rapport aux souris adultes (Enderlin et coll., 1997a ; Etchamendy et coll., 2001).

La consommation modérée d'alcool (éthanol 6% (v/v)) n'induit pas de modification du niveau d'expression des ARNm de ces récepteurs dans le cerveau de souris adultes. Par contre, les souris âgées alcoolisées présentent une «atténuation» de l'hypoexpression des TR $\alpha/\beta$  et des RAR $\beta$ .

#### **Expression de gènes cibles de l'AR et de la T3**

Nos résultats montrent une diminution significative de l'expression de RC3 et de GAP-43 (ARNm et protéines), dans le cerveau des souris âgées. Plus précisément, nous avons

mis en évidence une hypoexpression des ARNm de ces gènes cibles dans l'hippocampe (RC3 et GAP-43), le striatum (RC3) et le cortex cérébral (GAP-43).

La consommation modérée d'alcool n'induit pas de variation de l'expression de RC3 (ARNm et protéines), dans le cerveau des souris adultes. Ce résultat est en accord avec les données concernant les récepteurs nucléaires de l'AR et de la T3. Nos résultats ne mettent pas en évidence de variation globale de l'expression de GAP-43 (ARNm et protéines) dans le cerveau des souris adultes, néanmoins la consommation modérée d'alcool induit des modifications du profil d'expression de GAP-43, variables selon les structures cérébrales étudiées (diminution dans les champs CA1 de l'hippocampe, pas de variation significative dans les autres régions cérébrales).

Les souris âgées soumises aux mêmes conditions d'alcoolisation présentent une «atténuation» de l'hypoexpression de RC3 et de GAP-43, en accord avec les modifications, précédemment décrites, de l'expression des ARNm des récepteurs  $TR\alpha/\beta$  et  $RAR\beta$ .

**PUBLICATION 3**

**MODERATE ETHANOL CONSUMPTION SUPPRESSES AN AGE-RELATED  
RELATIONAL MEMORY DEFICIT IN MICE: INVOLVEMENT OF RETINOID  
AND TRIODOTHYRONINE SIGNALLING PATHWAYS**





**Moderate ethanol consumption suppresses an age-related memory deficit in mice:  
involvement of retinoid and triiodothyronine signalling pathways**

Catherine Boucheron<sup>1</sup>, Serge Alfos<sup>1\*</sup>, Stéphane Valério<sup>2</sup>, Valérie Enderlin<sup>1</sup>, Marianne Husson<sup>1</sup>,  
Véronique Pallet<sup>1</sup>, Robert Jaffard<sup>2</sup>, Paul Higuieret<sup>1</sup>

(en préparation)

<sup>1</sup> Unité de Nutrition et Signalisation Cellulaire (EA MENRT; USC INRA) ISTAB, Université  
Bordeaux 1, 33405 Talence cedex, France.

<sup>2</sup> Laboratoire de neurosciences cognitives, CNRS UMR 5106, Université Bordeaux 1, 33405  
Talence cedex, France.

**Key Words:** retinoic acid nuclear receptors, triiodothyronine nuclear receptors, RC3, GAP-43,  
ethanol, ageing, declarative memory.

## 1. INTRODUCTION

Vitamin A and its active derivatives (the retinoids) are non-steroid hormones that play critical role during embryogenesis and thereafter for maintenance of homeostasis of numerous vertebrate tissues (Ross *et al.*, 2000; Sporn *et al.*, 1994). Recent data suggest that retinoids are involved in the maintenance of the mature nervous function and in memory (Chiang *et al.*, 1998; Misner *et al.*, 2001; Etchamendy *et al.*, 2003a). The biological effects of retinoids are mediated through the binding of its active metabolite, retinoic acid (RA), to two families of nuclear receptors: RARs (receptors of all-*trans* and 9-*cis* retinoic acid stereoisomers) and RXRs (receptors specific of the 9-*cis* retinoic acid), both containing at least three isotypes designated  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ , encoded by separate genes (Chambon, 1996; Mangelsdorf *et al.*, 1995). These receptors belong to the steroid/thyroid hormone nuclear receptor superfamily and function as ligand-dependent transcription factors by binding to retinoid response elements (RAREs) in the promoter of target genes (Bastien and Rochette-Egly, 2004). Because RXR is the heterodimeric partner of the nuclear receptor superfamily, the retinoid signaling interacts closely with that of others members such as thyroid hormones (Chin and Yen, 1997).

Thyroid hormones are also involved in numerous functions as growth, differentiation and metabolism and have marked effects on adult neuronal functioning and memory (Bernal 2002; Smith *et al.*, 2002). The thyroid signal is mediated by the binding of its active metabolite, triiodothyronine (T3), to nuclear receptors (TR $\alpha$  and TR $\beta$ ) that regulate gene expression (Yen, 2001).

Among the several neuronal genes regulated by the retinoid and/or the thyroid hormone receptors, there are those of the neurogranin (RC3) and the neuromodulin (GAP-43). These Ca<sup>2+</sup>-sensitive calmodulin-binding proteins play a critical role in synaptic plasticity and spatial learning (Gerendasy and Sutcliffe, 1997; Pak *et al.*, 2000; Routtenberg *et al.*, 2000). The expression of RC3 is regulated by RA (Enderlin *et al.*, 1997a; Husson *et al.*, 2004), and by thyroid hormone (Iñiguez *et al.*, 1993; Guadaño-Ferraz *et al.*, 1997). GAP-43 is also regulated at a transcriptional level by RA (Grummer and Zachman, 2000; Husson *et al.*, 2004).

We have previously shown in mice that aging is associated with a reduced expression of brain RA and T3 nuclear receptors (RAR, RXR, TR) (Enderlin *et al.*, 1997a). Simultaneously we have observed an age-related decrease in the target gene RC3 in mouse hippocampus, associated with an impaired LTP and a specific memory deficit (Etchamendy *et al.*, 2001; Mons *et al.*, 2001). Retinoic acid administration in aged mice is able to reverse the decrease in

brain nuclear receptors and to alleviate the age-related memory deficit (Etchamendy *et al.*, 2001). These dysregulations of retinoid/thyroid signalling pathways have been pointed out as potential causes of age-related cognitive impairments.

Moreover, it is well known that chronic ethanol consumption can interfere with vitamin A and thyroid hormones metabolisms (Crabb *et al.*, 2001; Baumgartner *et al.*, 1994). Such interactions may be of major importance in physiological process because vitamin A and thyroid hormones play a key role in gene expression through their nuclear receptors. We have previously shown that chronic ethanol consumption in young mice induces a strong activation of retinoid and thyroid signaling pathways (nuclear receptors and target genes) (Alfos *et al.*, 1996), that could be responsible, at least in part, for some alcohol-related memory impairments (Alfos *et al.*, 2001). Moreover we have recently studied the combined effects of a chronic alcohol consumption (ethanol 12 % (v/v) for 5 months) and aging on the retinoid/thyroid nuclear action in the brain and demonstrated an overexpression of these pathways in adult mice and a reversion of their hypoexpression in aged mice (Alfos *et al.*, 2001 (Abstract); Krazem *et al.*, 2003a). Simultaneously, we observed a memory deficit in adult mice and a reduction of a selective age-associated memory deficit in alcohol-treated mice (Krazem *et al.*, 2003b).

In human, several large-scale population-based longitudinal studies have been done investigating the relationship between alcohol consumption and cognitive performance. Although, the available data of alcohol intake on cognitive functioning are often conflicting, numerous studies have reported that moderate alcohol consumption is associated with a decreased probability of cognitive impairments (Elias *et al.*, 1999; Zuccalà *et al.*, 2001) and Alzheimer's disease (Orgogozo *et al.*, 1997, Mukamal *et al.*, 2003).

In this context, the present study was designed to test the hypothesis that moderate ethanol consumption in mice could reverse the age-related hypoexpression of brain retinoid and thyroid hormone signalling pathways, and thus could reduce or suppress a specific memory deficit associated with aging. In these aims, we investigated the effect of 5 months of moderate ethanol consumption (ethanol 6%) in C57Bl/6 adult (12 months) and aged (22 months) mice on memory performances and, at a molecular level, on RA and T3 nuclear receptors and on some of their target genes involved in synaptic plasticity. Animals were submitted to a place discrimination task in a 8-arm radial maze using a two-stage behavioural paradigm that was previously used to distinguish between the acquisition and expression of declarative/relational memory (which was shown to be impaired in senescent and in hippocampal lesioned mice) and of procedural memory (which remained relatively intact in both cases) (Marighetto *et al.*, 1999; Etchamendy *et al.*, 2003b). The relative mRNA levels of RAR, RXR, TR and their target genes

(RC3 and GAP-43) in mice brain were quantified using a real-time PCR method and RC3 and GAP-43 mRNA expression patterns were investigated using an *in situ* hybridisation method. RC3 and GAP-43 protein levels were also measured investigated using western blot analyses.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### ***2.1. Animals***

The study was conducted in accordance with the European Communities Council Directives of 24 November 1986. Subjects were pathogen-free male mice of the C57Bl/6 strain from Charles-River Laboratories (Lyon, France). Eighty mice of two age ranges were selected for this study: 7 month-old (adult) and 17 month-old (aged). These animals were maintained on an automatic 12: 12-hr light/dark cycle in a temperature-controlled room ( $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ). The animals were housed in collective cages.

### ***2.2. Alcohol administration***

Animals of each age group were randomly assigned to one of the following experimental groups: adult-control (n=16), adult-alcohol (n=16), aged-control (n=16) and aged-alcohol (n=16). As their only source of fluid, mice of the ethanol-treated groups had free access to a solution of ethanol 6% (v/v) prepared from ethanol 95 %. The control groups were pair-fed mice, given an isocaloric solution of dextri-maltose. Dry food (Extra-Labo, Pietrement, France) was freely available throughout the experiment. Animals remains under these drinking conditions for 5 consecutive months prior to behavioural testing and during the 3 weeks of test (see below). However they were housed in individual cages at least 2 weeks before the start of behavioural testing in order to control food deprivation levels individually. Moreover, to avoid any acute effects of alcohol on behaviour, the bottle containing ethanol or dextri-maltose was removed from the cage 2 hours before each testing session. The bottle was replaced in the cage immediately after completion of the session.

### ***2.3. Behavioural testing***

Behavioural testing was carried out using a fully automated, elevated, 8-arm radial maze. The procedure was described in full elsewhere (see Marighetto *et al.*, 1999; Etchamendy *et al.* 2001). Briefly, the animals were progressively food deprived (over three days) in order to maintain their body weight at a stable level, i.e. 90% of the free feeding weight throughout the

duration of testing. Then they were first habituated to the maze over a period of two days (shaping). During this period, they were individually allowed to move freely in the maze until they had collected a reward from each of the eight pre-baited arms.

### 2.3.1. Discrimination tasks

The experimental design is shown in Fig. 1. For discrimination training, each subject was then individually assigned six adjacent arms. Out of these, three served as positive (baited) arms and the remaining three served as negative (not baited) arms. The relative locations of these arms were such that all six could be grouped into three pairs of adjacent arms with opposing valence (see stage 2).

### 2.3.2. Stage 1

In stage 1, the six arms were presented one at a time using a go-no-go discrimination procedure [i.e. in each trial, the door to only one arm (which could be a positive or negative one) was open]. Each daily session consisted of 24 trials separated by a 10 s interval with four presentations of each of the six arms according to a pseudo-randomised sequence. Subjects were trained in stage 1 until they reached a criterion performance with the ratio between the median latency to enter negative and positive arms being  $> 1.5$  for the (last) session and with an overall ratio  $> 1.3$  for the last 2 consecutive sessions. They were then shifted to stage 2 for two consecutive days.

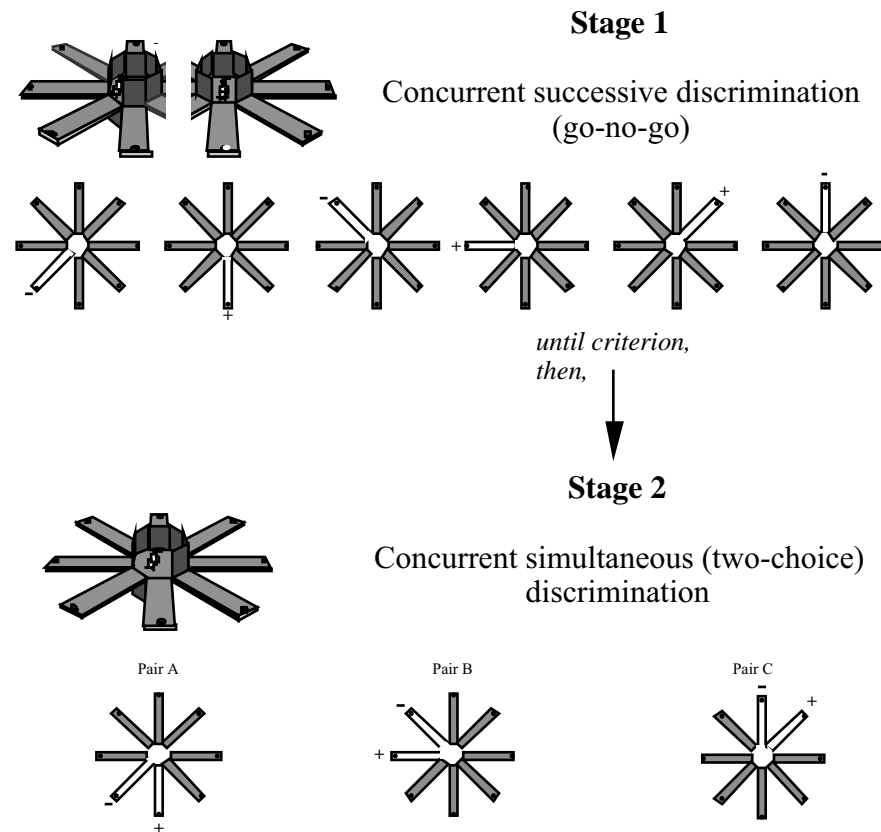
### 2.3.3. Stage 2

In this stage, the reward contingency of the discriminanda remained unchanged but the presentation was modified. The six arms were now grouped into, and presented as, three adjacent pairs (Fig. 1). Each of the two daily sessions of these simultaneous two-choice discriminations comprised 20 consecutive trials with alternate presentation of each pair, according to a pseudo-random sequence and separated by a 10 s. interval.

### 2.3.4. Measures of performances

In stage 1 (go-no-go discrimination), choice accuracy was indexed by the entry latency ratio  $[(E-) - (E+)] / [(E-) + (E+)]$  where E- represents the median latency to enter negative arms and E+ the median latency to enter positive arms (chance: 0). In stage 2, accuracy was measured by percentage correct (chance: 50 %).

All, mice were sacrificed by decapitation for biochemical analysis the day after completion of behavioural testing. For mRNA quantification and Western blot the brains were rapidly removed and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for subsequent analysis. For *in situ* hybridisation, the brains were removed and fixed according to the procedure described below.



**Figure 1 :** Design of the behavioural procedure.

#### 2.4. Quantification of mRNA

Extraction of brain RNA was performed by using the total RNA isolation system RNAagents® (Promega Z5111, USA) according to the procedure recommended by the manufacturer.

Preparation of cDNA and mRNA quantification by real-time PCR was performed as described previously (Husson *et al.*, 2003). The oligonucleotides primers for GAPDH (housekeeping gene), RAR $\beta$ , RAR $\alpha$ , RXR $\beta/\gamma$ , TR $\alpha/\beta$  and RC3 were the same as those previously used (Alfos *et al.*, 1996; Alfos *et al.*, 2001; Husson *et al.*, 2003). The forward and reverse primer sequences for GAP-43 were 5'-GTG ATG CAC CAG CTG CTG AGG-3' (nt 313-333) and 5'-GGG GAG TTA TCA GTG GTA GC-3' (nt 571-552) (Hulo *et al.*, 2002).

Primers were purchased from Genset (Paris, France). The results were normalized by the ratio of the relative concentration of target to that of GAPDH sample. The real-time PCR method allowed to ensure that the expression level of GAPDH was unaffected by aging or ethanol treatment.

## ***2.5. In situ hybridisation***

### ***2.5.1. Tissue preparation***

The brains were removed and fixed overnight in 2% (w/v) paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4), immersed in the same buffer containing 30% sucrose for 2 days. Then brains were rapidly frozen in cooled isopentane and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Serial coronal sections (20 $\mu\text{m}$ ) were cut using standard microtome techniques and were thaw-mounted onto gelatine-coated-slides and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until processing.

### ***2.5.2. Probes and in situ hybridisation analysis***

RC3 mRNA distribution was analysed by *in situ* hybridisation using a 60-mer oligodeoxyribonucleotide probe (Genset, France) which is complementary to position 40-99 of the 5' coding region of transcript 140 (Rhyner *et al.*, 1990). GAP-43 mRNA distribution was analysed by *in situ* hybridisation using an antisense 50-mer oligodeoxyribonucleotide probe (Genset, France) which is complementary to position 220-270 of the coding region of the rat GAP-43 mRNA sequence (Basi *et al.*, 1987; Bisby *et al.*, 1996; Karimi-Abdolerezaee and Schreyer, 2002). A GAP-43 sense probe was also synthesised (Genset, France) to provide a negative control for specificity of probe binding. Probes were end-labeled with [ $\alpha$ - $^{35}\text{S}$ ]deoxy-ATP (ICN Pharmaceuticals, France) using terminal deoxynucleotidyl transferase (Amersham Pharmacia, France). Hybridisations were carried out as previously described (Mons *et al.*, 2001).

### ***2.5.3. Quantification and image analysis***

For assessment of the relative amounts of RC3 and GAP-43 mRNA in various regions of mice brain sections, X-ray autoradiographs were digitised using an image analysis system (Samba Software, France). Separate optical densities (OD) measurements within a particular brain region were made using three consecutive sections per animal, which were anatomically identified according to Franklin and Paxinos (1997). Background OD was subtracted from each image. The mRNA densities for each region were expressed as a percentage of the mean mRNA density observed in the adult control group within the same brain region.

## ***2.6. Gap-43 and RC3 Western blot analysis***

Western blot analysis was performed according to the procedure of Watson *et al.* (1990) with minor modifications, as previously described by Mons *et al.* (2001), on frozen brain tissue from either ethanol mice or pair-fed mice of the two age groups. The constancy of the intensity of  $\beta$ -actin was verified in the present experimental conditions, in order to determine whether the changes in RC3 and GAP-43 protein levels were associated with generalized effect of aging or ethanol consumption. Antibodies for  $\beta$ -actin, RC3 and GAP-43 are the same as those previously used (Mons *et al.*, 2001; Husson *et al.*, 2004). The staining intensity of protein bands was determined using Quantity One, a quantification software (Bio-Rad Laboratories, USA). The relative levels of neurogranin (RC3) and neuromodulin (GAP-43) proteins were determined as percentage of the same proteins in control mice.

## ***2.7. 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, when adequate, by post hoc multiple comparisons (Fisher's PLSD) using StatGraphics Plus Software (Manugistics, Inc., USA). Statistical analysis for the behavioural study was performed using three-way ANOVAs with age and treatment as between groups factor and sessions as within subject factor. Values  $< 0.05$  were considered to be statistically significant.

# **3. RESULTS**

## ***3.1. Nutritional and alcohol intake***

As shown in table 1, total calories ingested between the four groups of mice were significantly different. Aged-control mice consumed less dry food and dextri-maltose solution than adult-control mice. Moreover, the average amount of alcohol intake during the five-month period in the two age groups was significantly different and was  $5.6 \pm 0.1$  g ethanol/kg/day and  $7.6 \pm 0.1$  g ethanol/kg/day for adult and aged-alcohol mice, respectively. However, expressed in percentage of calories ingested, the amount of ethanol consumed was the same in both adult and aged mice and corresponded to about 10% of total calories ingested. At the end of the 5-



month period, mice of both ethanol groups exhibited no significant difference in body weight as compared to their age-matched control groups.

**Table 1:** Mean daily caloric intake as dry food and liquid solutions by adult and aged mice used in the study.

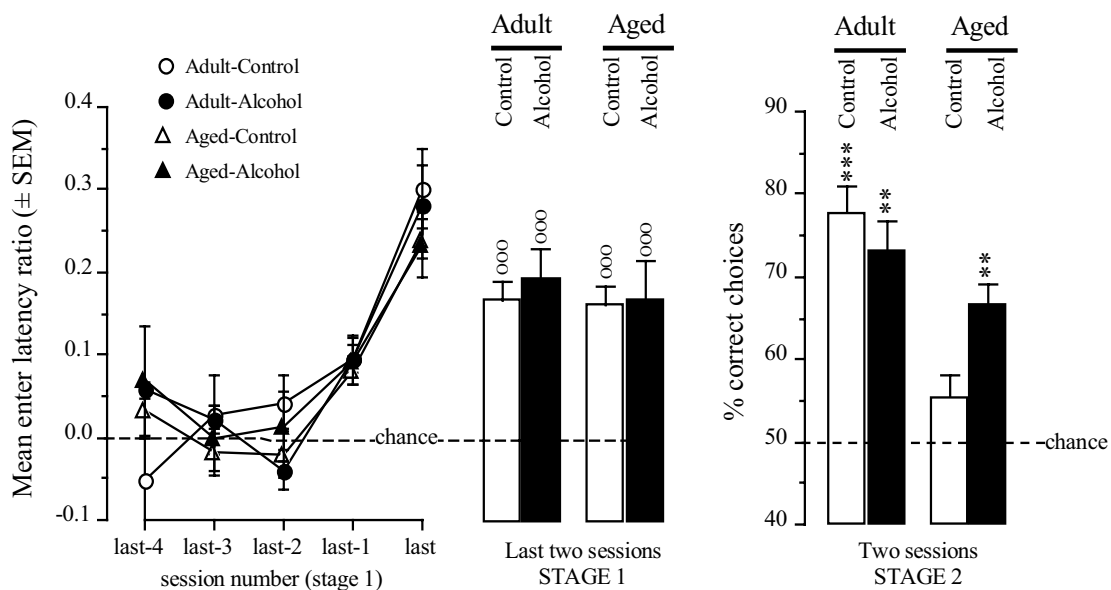
Group	Mean caloric intake (kJ/kg/day)			
	Dry food	Dextri-maltose Solution	Ethanol solution	Total
<b>Adult-control</b>	1537 ± 14.5 <sup>a</sup>	270 ± 4 <sup>a</sup>	0	1807 ± 5 <sup>a</sup>
<b>Adult-alcohol</b>	1539 ± 31 <sup>a</sup>	-	200 ± 4 <sup>a</sup>	1739 ± 36 <sup>b</sup>
<b>Aged-control</b>	1430 ± 38 <sup>b</sup>	181 ± 2.5 <sup>b</sup>	0	1611 ± 39 <sup>c</sup>
<b>Aged-alcohol</b>	1249 ± 30.5 <sup>c</sup>	-	146.5 ± 2.5 <sup>b</sup>	1395.5 ± 33 <sup>d</sup>

Values are mean ± SEM from 10 animals of each group. Values not sharing the same superscript letter (a, b, c and d) are significantly different from each other,  $p < 0.05$  (Fisher test).

### 3.2. Behavioural data

Stage 1. All mice attained the criterion level of performance within the 16 sessions allowed. The number of sessions needed to achieve this criterion was similar among the four groups (adult-control:  $10.88 \pm 1.22$  sessions; adult-alcohol:  $10.38 \pm 1.13$ ; aged-control:  $12.88 \pm 0.88$ ; aged-alcohol:  $11.50 \pm 0.71$ ) and neither the effect of age, treatment nor their interaction reached the statistical level of significance ( $F(1,28) < 2.4$ ; all  $p$  values  $> 0.13$ ). As shown in Figure 2, left, there was a progressive increase in entry latency ratio with all groups displaying significant learning over the last five sessions (three-way ANOVA, effect of sessions:  $F(4,112) = 33.9$ ;  $p < 0.001$ ) but with no other effect reaching the statistical level of significance (all  $F$  values  $< 1.07$ ; all  $p$  values  $> 0.35$ ). Finally, analysis restricted to the last two sessions of training (Figure 2, middle) indicated that, before being shifted to stage 2, the four groups displayed an above chance level (all  $p$  values  $< 0.001$ ) and highly similar performance [group effect:  $F(3,28) = 0.42$ ;  $p = 0.73$ ].

Stage 2. The mice were confronted with the three simultaneous discriminations composed of the six arms presented individually to them in stage 1. As shown in Figure 2, right, this first led to an age-related impairment of discrimination performance as, unlike the adult-control group ( $77.8 \pm 3.3$  % over the two sessions), the aged-group displayed close-to-chance level performance ( $55.6 \pm 2.5$  %). Second, and more importantly, this age-related difference was reduced by moderate ethanol consumption, mainly because aged mice of the ethanol group performed better ( $66.9 \pm 2.3$  %) than their age-matched control groups. A three-way ANOVA performed on these data yielded a significant main effect of age [ $F(1,28) = 25.6$ ;  $p < 0.01$ ] and a significant age x treatment interaction [ $F(1,28) = 7.55$ ;  $p = 0.01$ ] with the aged-ethanol group performing significantly better than the aged-control group (*post hoc* Fisher test:  $p < 0.01$ ). In contrast, moderate ethanol consumption in adult mice had no effect on memory performance.



**Figure 2:** Evolution of the mean entry latency ratio ( $\pm$  SEM) over the last five sessions of training prior to reaching criterion (*left*) and over the last two sessions (*middle*) of stage 1 in adult and aged mice of the ethanol and control groups ( $n = 8$  each group) and mean percent correct choices ( $\pm$  SEM) on the three-pair simultaneous discrimination over the two sessions of stage 2 (*right*).

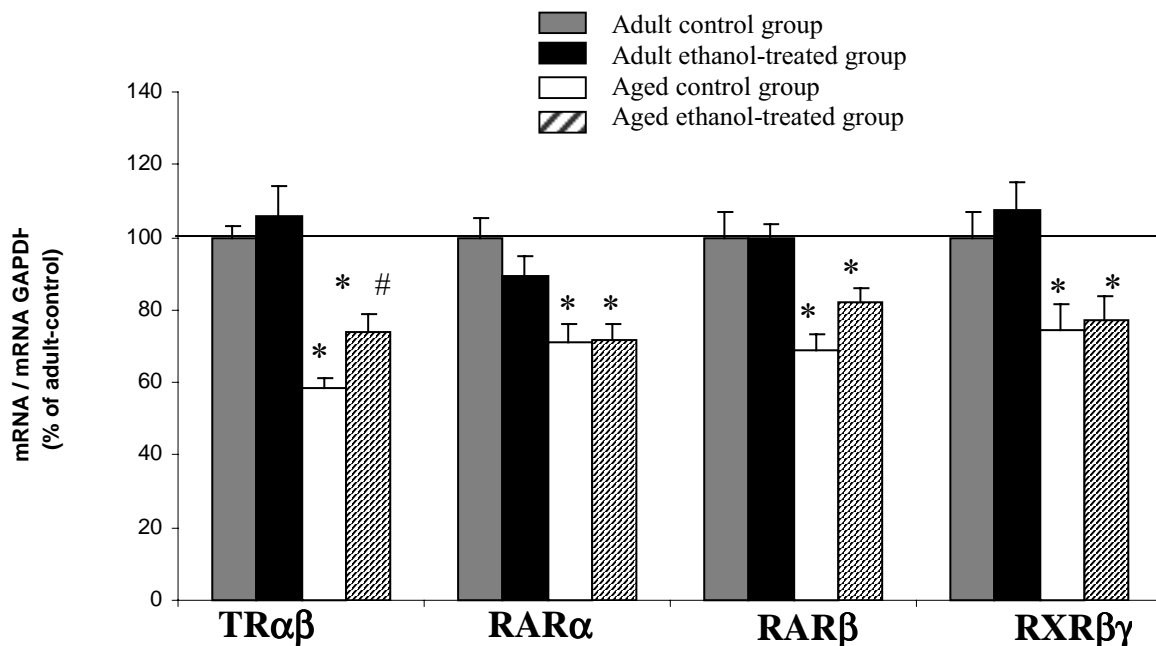
ooo significantly different from chance :  $p < 0.001$ . \*\* Significantly different from the aged-control group \*\*  $p < 0.01$  ;\*\*\*  $p < 0.001$  (*post hoc* Fisher test).

### 3.3. Biochemical data

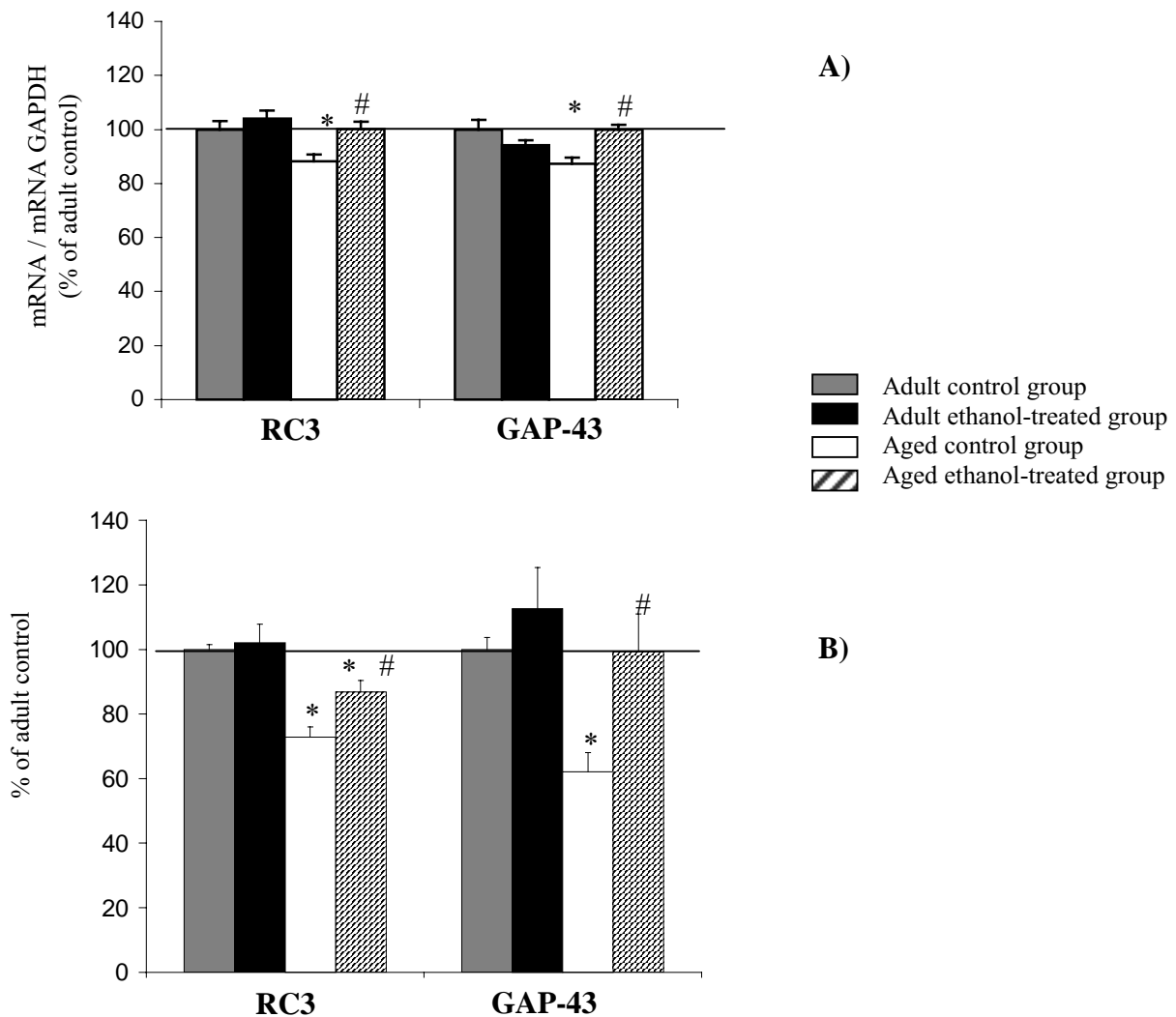
#### 3.3.1. Effect of aging and moderate ethanol consumption on brain TR $\alpha$ / $\beta$ , RAR $\alpha$ , RAR $\beta$ and RXR $\beta$ / $\gamma$ mRNA levels

In the present study, significant age-related decreases in mRNA levels of nuclear receptors TR $\alpha$ / $\beta$ , RAR $\alpha$ , RAR $\beta$  and RXR $\beta$ / $\gamma$  (- 42 %; - 29 %; - 31 % and - 26 %, respectively,  $p < 0.05$ ) were observed in the brain of 22 month-old control mice as compared with 12 month-aged mice (Fig. 3).

The moderate alcohol consumption did not induced, in adult mouse brain, any modification in RA or T3 nuclear receptor mRNA levels (Fig. 3). In contrast, aged mice submitted to the same ethanol treatment displayed a significant increase in brain TR $\alpha$ / $\beta$  mRNA (+ 26 % versus aged control group,  $p < 0.05$ ) and a slight but not significant increase in RAR $\beta$  mRNA (+ 21 % versus aged control group,  $p < 0.15$ ). These animals displayed the same expression level of RAR $\alpha$  and RXR $\beta$ / $\gamma$  mRNA as the aged-control group.



**Figure 3:** Effect of moderate ethanol consumption on the mRNA level of T3 and RA nuclear receptors in the brain of adult (12 months) and aged (22 months) mice. Data bars represent mean  $\pm$  SEM of duplicate measures performed on five animals ( $n = 5$ ). *Post hoc* Fisher test: \*  $p < 0.05$  significantly different from adult-control mice and #  $p < 0.05$  significantly different from aged-control mice.

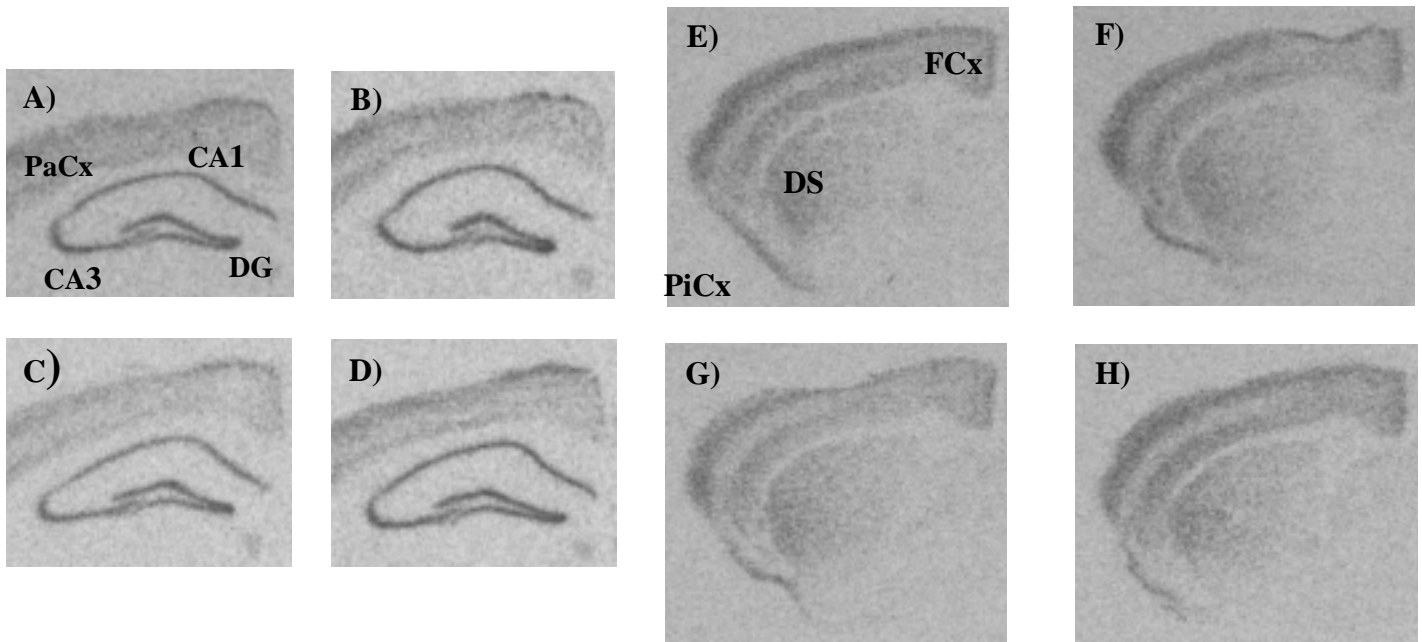


**Figure 4:** Effect of moderate ethanol consumption on the expression of RC3 and GAP-43 mRNA (A) and protein (B) in the brain of adult (12 months) and aged (22 months) mice. Data bars represent mean  $\pm$  SEM of duplicate measures performed on five animals ( $n = 5$ ). *Post hoc* Fisher tests: \*  $p < 0.05$  significantly different from adult-control mice and #  $p < 0.05$  significantly different from aged-control mice.

### 3.3.2. Effect of aging and moderate ethanol consumption on RC3 and GAP-43 mRNA levels

First of all, the effect of aging on RC3 and GAP-43 expression levels was studied. As shown in Figure 4, aged-control mice displayed significant decreases in RC3 mRNA and protein levels in whole brain (- 12 %,  $p < 0.05$  and - 27 %,  $p < 0.01$ , respectively, versus adult control group). RC3 mRNA expression was also studied in several brain regions by in situ

hybridisation as illustrated in Figure 5. The results presented in Figure 6 confirm those obtained in whole brain. Indeed, significant age-related decreases in RC3 mRNA levels in dorsal striatum and in dorsal hippocampus subfields, CA1, CA3 and dentate gyrus (- 42.5 %, - 15 %, - 15.5 % and - 15.5 %, respectively,  $p < 0.01$ , versus adult-control mice). RC3 mRNA was also expressed in cerebral cortex, however no significant age-related modification in RC3 mRNA expression was evidenced in frontal, parietal or piriform cortex (Figure 5).



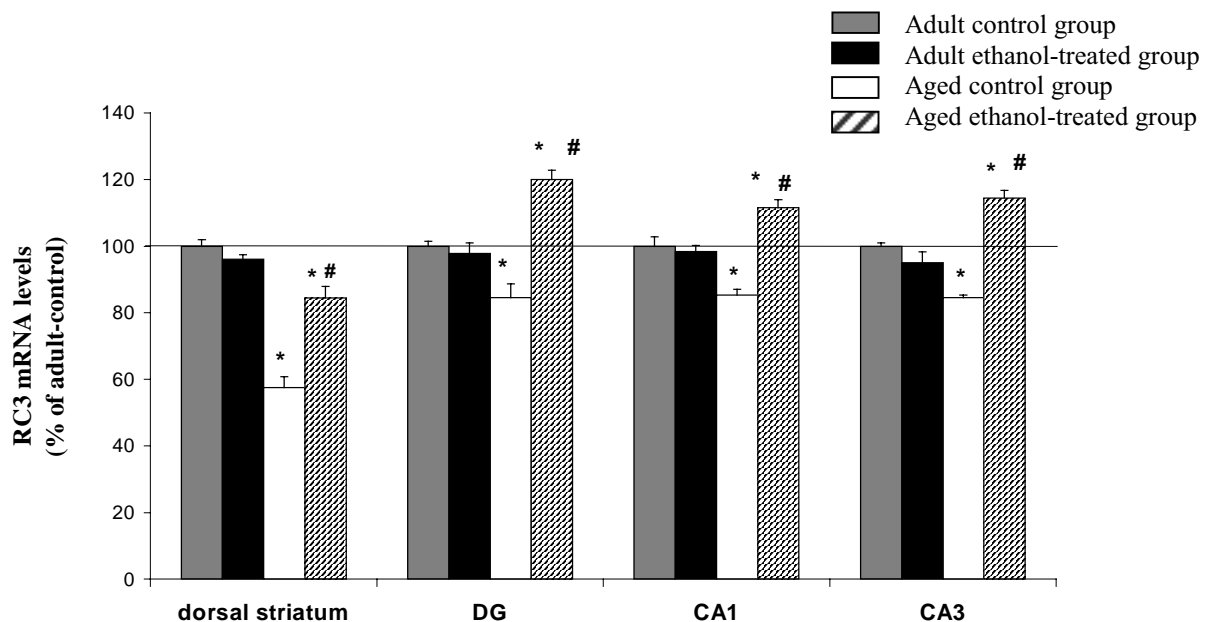
**Figure 5:** Dark-fields photomicrographs of coronal sections illustrating the distribution pattern of RC3 mRNA expression in different brain regions of the adult-control, the adult-alcohol, the aged-control and the aged-alcohol mice; in different cortex subfields, in the dorsal hippocampus (A), (B), (C) and (D), respectively, and in the dorsal striatum (E), (F), (G) and (H) respectively.

CA1, field CA1 of Ammon's horn, pyramidal layer; CA3, field CA3 of Ammon's horn, pyramidal layer; DG, dentate gyrus, granular layer; DS, dorsal striatum; FCx, frontal cortex; PaCx, parietal cortex; PiCx, piriform cortex.

Moreover, aged mice displayed significant decreases in GAP-43 mRNA and protein levels in whole brain (- 13 %,  $p < 0.05$  and - 38 %,  $p < 0.02$ , respectively). The results of in situ hybridisation presented in Table 2 revealed a significant decrease in GAP-43 mRNA level in CA1, CA3 and parietal cortex (- 77.5 %, - 57 % and - 77.5 %, respectively,  $p < 0.01$ ), and a

non-significant decrease in dentate gyrus (- 20.5 %,  $p < 0.20$ ). In contrast, an age-related significant increase in GAP-43 mRNA expression was observed in hypothalamus (+ 20 %,  $p < 0.02$ ). The specificity of the in situ hybridisation probe was demonstrated using sens GAP-43 probe as a negative control.

Moderate alcohol consumption produces distinct effect on RC3 and GAP-43 mRNA and protein expression according to the age of the mice. Indeed, in adult mice, moderate alcohol consumption did not induce any modification in RC3 protein nor mRNA levels in any brain regions (Figures 4 and 6). In contrast, moderate alcohol consumption in aged mice produced a significant increase, versus aged pair-fed mice, in RC3 mRNA and protein levels in whole brain (+ 13.4 %,  $p < 0.05$  and + 19 %,  $p < 0.05$ , respectively) (Figure 4), and in RC3 mRNA in dorsal striatum, dentate gyrus, CA1, CA3, parietal and frontal cortex (+ 47 %, + 42 %, + 31 %, + 35 %, + 23 % and + 58 %, respectively,  $p < 0.01$ ) (Figures 5 and 6).



**Figure 6:** RC3 mRNA expression pattern in the dorsal striatum and in dorsal hippocampal subfields of adult (12 months) and aged (22 months) control and ethanol-treated mice. Histograms represent the optical density values (mean  $\pm$  SEM) measured in the dorsal striatum and in the dorsal hippocampal fields on six animals ( $n = 6$ ) for each group normalized to the adult control group.

*Post hoc* Fisher tests: \*  $p < 0.05$  significantly different from adult control mice and #  $p < 0.05$  significantly different from aged control mice.

CA1, field CA1 of Ammon's horn, pyramidal layer; CA3, fields CA3 of Ammon's horn, pyramidal layer; DG, dentate gyrus, granular layer.

Concerning GAP-43, mRNA and protein levels in whole brain, and GAP-43 mRNA expression in CA3 subfield of hippocampus, frontal, parietal and piriform cortex, thalamus, hypothalamus, amygdaloidal complex and cerebellum were not affected by moderate alcohol consumption in adult mice (Figure 4 and Table 2).

Nevertheless, moderate alcohol consumption induced a significant decrease in GAP-43 mRNA content in CA1 and dentate gyrus (- 36 %,  $p < 0.03$ ; - 20 %,  $p < 0.02$ ) in adult mice (Table 2). On the contrary, as shown in Figure 4, in aged mice ethanol induced a significant increase in mRNA and protein expression levels in whole brain (+ 14,5 %,  $p < 0.05$  and + 60 %,  $p < 0.03$ , respectively, versus aged-control mice). Moreover, a significant increase in mRNA levels in dentate gyrus, parietal cortex and thalamus (+ 46 %,  $p < 0.04$ ; + 342 %,  $p < 0.01$  and + 19.5 %,  $p < 0.03$ , respectively, versus aged control mice) was observed (Table 2).

**Table 2:** GAP-43 mRNA expression pattern in different brain regions of adult (12 months) and aged (22 months) control and ethanol-treated mice.

	Adult-control	Adult-alcohol	Aged-control	Aged-alcohol
Dentate gyrus	3.34 ± 0.21	2.68 ± 0.22	2.65 ± 0.57	3.88 ± 0.50 #
CA1	3.07 ± 0.25	1.97 ± 0.18 *	0.69 ± 0.28 *	1.42 ± 0.49 *
CA3	3.58 ± 0.33	3.11 ± 0.24	1.53 ± 0.24 *	2.21 ± 0.22 *
Frontal cortex	4.74 ± 0.47	4.66 ± 0.35	4.92 ± 0.16	5.51 ± 0.66
Parietal cortex	1.99 ± 0.51	2.52 ± 0.18	0.45 ± 0.08 *	1.99 ± 0.20 #
Piriform cortex	10.66 ± 0.49	11.34 ± 0.81	10.73 ± 0.59	11.81 ± 1.05
Thalamus	8.85 ± 0.51	9.65 ± 0.40	9.51 ± 0.58	11.38 ± 0.68 *#
Hypothalamus	9.50 ± 0.82	10.61 ± 0.32	11.43 ± 0.46 *	12.73 ± 0.29 *
Amygdaloid complex	9.56 ± 0.56	10.52 ± 0.59	10.44 ± 0.21	11.24 ± 0.83
Cerebellum	8.62 ± 0.47	9.12 ± 0.32	9.93 ± 0.89	11.10 ± 0.86 *

*Post hoc* Fisher tests: \*  $p < 0.05$  significantly different from adult control mice and #  $p < 0.05$  significantly different from aged control mice.

CA1, field CA1 of Ammon's horn, pyramidal layer; CA3, fields CA3 of Ammon's horn, pyramidal layer.

## **4. DISCUSSION**

The originality of the present study concerns the use of a moderate alcohol administration protocol (ethanol 6 % for 5 months) to investigate in adult and aged mice the effects of alcohol on the expression of RA and T3 nuclear receptors and associated target genes involved in synaptic plasticity process (RC3 and GAP-43), and on relational memory. Our results show that moderate alcohol consumption in aged mice induces an attenuation of the age-related hypoexpression of RAR $\beta$  and TR $\alpha/\beta$ , associated with a normalisation of RC3 and GAP-43 mRNA and protein expression. Moreover this moderate dose of alcohol produced an attenuation of a selective age-related memory deficit. In contrast, moderate ethanol consumption had no significant effect on RA and T3 signalling pathways and on memory performance in adult mice.

### **4.1. Involvement of RA and T3 signalling pathways dysfunction in cognitive deficits in aged mice**

In accordance with previous findings (Etchamendy *et al.*, 2001; Krazem *et al.*, 2003b) our present results show that, as compared to adult mice, aged mice learned the initial successive (go-no-go) discrimination task but were severely impaired in stage 2, in which they failed to choose the + arms significantly more often than the – arms. Concomitantly, we also observed a decrease in mRNA expression of RA and T3 nuclear receptors in aged mouse brain which is in agreement with previous data obtained in rat and mouse (Enderlin *et al.*, 1997a; Enderlin *et al.*, 1997b; Etchamendy *et al.*, 2001). Because these receptors are regulated by their own ligands (Yamagata *et al.*, 1993; Lebel *et al.*, 1992; Husson *et al.*, 2003), these data suggest that the age-related decrease in brain retinoid and thyroid nuclear receptor expression may result, at least in part, from a reduced bioavailability of RA and T3, at a nuclear level. In order to investigate the neurobiological consequences of such a decrease in RA and T3 nuclear receptors levels in brain, we study the expression of two of their target genes involved in synaptic plasticity: RC3 and GAP-43. Our results showed a decrease in GAP-43 and RC3 mRNA and protein expression levels in whole brain, in accordance with the age-related decrease in RAR and TR mRNA expression level. More precisely, we showed a RC3 and GAP-43 mRNA hypoexpression mostly in dorsal striatum (RC3) and in dorsal hippocampus (RC3 and GAP-43). These results confirmed previous studies showing a decrease in RC3 mRNA levels in aged mouse brain (Enderlin *et al.*, 1997a; Etchamendy *et al.*, 2001) and more particularly in the



hippocampus (Krazem *et al.*, 2003a; Mons *et al.*, 2001). Moreover, the results concerning GAP-43 were coherent with data obtained in rat brains which revealed an age-related decrease in GAP-43 mRNA and protein levels in the hippocampus (Casoli *et al.*, 2001).

Thus, these results suggest that aging induces a decrease in RA and T3 brain bioavailability and a consecutive hypoexpression of RA and T3 nuclear receptors that in turn induces a down-regulation of target genes, such as RC3 and GAP-43, implicated in learning and memory. This hypothesis is coherent with previous data showing (i) a significant decrease in mRNA expression levels of these nuclear receptors and target genes, RC3 and GAP-43, in the striatum and the hippocampus of vitamin A deficient rats (Husson *et al.*, 2004), (ii) memory deficits in vitamin A deficient mice (Etchamendy *et al.*, 2003a).

#### **4.2 Distinct effects of moderate alcohol consumption, according to the age, on RA and T3 signalling pathways and on relational memory**

Here we have shown that moderate alcohol consumption at the daily average dose of 6 g ethanol/kg/day resulted in the same overall attenuation of the selective age-related relational memory deficit as the one previously observed following alcohol administration at the higher dose of 12 g/kg/day (Krazem *et al.*, 2003b). However, in contrast with our previous results, this moderate ethanol consumption had no deleterious effects on memory performance in adult mice. Both the nature and the selectivity of the cognitive improvement observed in moderate alcohol-consuming aged mice suggests that the hippocampus would be the main central nervous system target of the moderate alcohol-mediated facilitation (Eichenbaum *et al.*, 1988).

In the same way, moderate ethanol consumption reduced the age-related hypoexpression of TR $\alpha$ / $\beta$  and RAR $\beta$  mRNA in aged mouse brain as previously described with the higher dose of alcohol (Alfos *et al.*, 2001 (Abstract)). By contrast with previous data obtained in adult mouse brain showing an ethanol-related increase in RAR $\beta$  and TR $\alpha$ / $\beta$  mRNA expression levels (Alfos *et al.*, 1996; Alfos *et al.*, 2001; Alfos *et al.*, 2001 (Abstract)), adult mice submitted to this moderate dose of alcohol did not display any modification of RA and T3 nuclear receptors (RAR $\beta$ , RAR $\alpha$ , RXR $\beta$ / $\gamma$  and TR $\alpha$ / $\beta$ ) mRNA levels in brain. Furthermore, as previously described (Grummer and Zachman, 2000; Alfos *et al.*, 2001) the present data show that the expression of RAR $\alpha$  mRNA was unaffected by ethanol consumption whatever the age of the mice.

Concerning the effect of moderate ethanol consumption on RA and T3 target genes implicated in synaptic plasticity, as previously described, ethanol treatment determined differential effects in adult versus aged animals (Casoli *et al.*, 2001; Krazem *et al.*, 2003a). Adult mice submitted to a moderate alcohol consumption did not display any significant alteration in GAP-43 and RC3 expression levels (mRNA and proteins), in agreement with unchanged RA and T3 nuclear receptor expression levels. Aged ethanol-treated mice displayed attenuations or reversion, according to the cerebral region studied, of the age-related hypoexpression of GAP-43 and RC3 mRNA. Additionally, the suppression of the age-related hypoexpression of these neuronal proteins was observed in ethanol-treated whole brain. Furthermore, the present results demonstrate that a same alcohol intake may have distinct effects on synaptic plasticity in the different anatomical structures, especially during ageing, as previously suggested in a study comparing ethanol effect on GAP-43 protein levels in hippocampus and cerebellum (Casoli *et al.*, 2002).

All together, these results demonstrated not only a dose-effect of alcohol consumption on RA and T3 signalling pathways and on memory (i.e. high dose of alcohol produced a memory deficit in adult mice and increase RA and T3 nuclear receptor expression whereas moderate dose of alcohol had no effect), but also an age-dependent effect of alcohol consumption (i.e. moderate alcohol consumption induced an attenuation of memory deficit in aged mice and normalized RA and T3 nuclear receptors mRNA levels, whereas the same dose of alcohol had no effect in adult mice).

#### **4.3 Possible cellular mechanisms involved in the attenuation of the age-related memory deficits by moderate alcohol consumption**

The question that arise is how moderate alcohol consumption is able to attenuate a specific age-related memory deficit in mice. The present results showing an increase in RA and T3 nuclear receptors mRNA expression in aged mice brain induced by moderate ethanol consumption and the previous results concerning the overexpression of these signalling pathways in the brain of alcohol-treated mice (Alfos *et al.*, 1996; Alfos *et al.*, 2001) suggest that chronic alcohol consumption induces an increase in T3 and RA nuclear bioavailabilities. This hypothesis is supported by numerous data describing the effects of ethanol and vitamin A (Crabb *et al.*, 2001) and thyroid hormones metabolisms (Baumgartner *et al.*, 1994; Eravci *et al.*, 2000) that can lead to a modification of the amount or the bioavailability of retinoic acid and triiodothyronine. Knowing that it has been suggested that aged mice displayed a decrease in RA

and T3 bioavailability (see above), it may be hypothesis that moderate ethanol consumption in mice improves the age-associated memory decline by restoring a sufficient level of RA and T3 necessary for transcriptional events regulated by their nuclear receptors in brain. This hypothesis is in agreement with data suggesting an involvement of these signalling pathways in synaptic plasticity and memory process. Indeed, recent studies using knock-out or vitamin A-deficient animals strongly suggest a major role of brain retinoid signalling in higher cognitive function (Chiang *et al.*, 1998; Misner *et al.*, 2001, Etchamendy *et al.*, 2003a). Furthermore, thyroid hormones are also essential for the adult central nervous system function and hypothyroidism has been associated with memory impairment (Smith *et al.*, 2002). It is now well established that these signalling pathways are involved in the regulation of several genes supporting the functional synaptic properties required for memory processing such as RC3 and GAP-43 studied here (Gerendasy and Sutcliffe, 1997; Grummer and Zachman, 2000) but also NMDA receptors (Lee *et al.*, 2003) or neurotrophic factors and cholinergic-specific proteins (Malik *et al.*, 2000). Our results showing an increase in GAP-43 and RC3 expression, especially in hippocampus, associated with a normalization of the TR $\alpha$  $\beta$  and RAR $\beta$  mRNA level in moderate ethanol-treated aged mouse brains suggest that the effects of moderate ethanol consumption on memory process are mediated by RA and T3 signalling pathways that regulated genes encoding for synaptic plasticity proteins. These results should be compared with those of Etchamendy *et al.* (2001) showing that acute RA administration in aged mice restored RA receptors and RC3 expression level in the brain back to that of adult mice and suppressed the same age-related memory deficit.

In conclusion, the present and previous results demonstrated a dose and age-dependent effect of alcohol consumption on RA and T3 nuclear receptor expression, on associated target genes RC3 and GAP-43, and on relational memory. The main finding of this study is a reversal effect of moderate ethanol consumption on a specific age-related memory deficit associated with a normalization of the cerebral expression of RA and T3 nuclear receptors together with a restoration of hippocampal RC3 and GAP-43 expression. These results strongly suggest that the normalization, induced by moderate ethanol consumption, of RA and T3 nuclear receptors hypoexpression in aged mice brain restore a sufficient expression level of target gene supporting the functional synaptic properties required for relational memory process. This highlight the critical role of retinoid and thyroid hormones in synaptic plasticity process and memory. Moreover, the facilitative effect of moderate ethanol consumption in mice observed in this study is congruent with studies conducted in elderly people showing that moderate alcohol

consumption is associated with a decreased probability of cognitive impairments (Elias *et al.*, 1999; Zuccalà *et al.*, 2001). Studies are underway to investigate the possible relationship between RA and T3 nuclear receptor expression and cognitive function in elderly drinkers and non-drinkers.

## REFERENCES

- Alfos, S., Higuieret, P., Pallet, V., Higuieret, D., Garcin, H., Jaffard, R., 1996. Chronic ethanol consumption increases the amount of mRNA for retinoic acid and triiodothyronine receptors in mouse brain. *Neurosci. Lett.* 206, 73-76.
- Alfos, S., Boucheron, C., Pallet, V., Higuieret, D., Enderlin, V., Beracochea, D., Jaffard, R., Higuieret, 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, 1506-1514.
- Alfos, S., Krazem, A., Pallet, V., Higuieret, D., Enderlin, V., Beracochea, D., Jaffard, R., Higuieret, P. 2001 (abstract). Effects of ethanol consumption on the expression of retinoic acid and triiodothyronine nuclear receptors and on cognitive performance during aging (abstract). *Alcohol Clin. Exp. Res.* (Suppl 5) 25, 107A.
- Basi, G.S., Jacobson, R.D., Virag, I., Schilling, J., Skene, J.H.. 1987. Primary structure and transcriptional regulation of GAP-43, a protein associated with nerve growth. *Cell.* 49, 785-791.
- Bastien, J., Rochette-Egly, C., 2004. Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. *Gene.* 328, 1-16.
- Baumgartner, A., Heyne, A., Campos-Barros, A., Kohler, R., Muller, F., Meinhold, H., Rommelspacher, H., Wolffgramm, J., 1994. Hypothalamic-pituitary-thyroid axis in chronic alcoholism. II. Deiodinase activities and thyroid hormone concentrations in brain and peripheral tissues of rats chronically exposed to ethanol. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 18, 295-304.
- Bernal, J., 2002. Action of thyroid hormone in brain. *J. Endocrinol. Invest.* 25, 268-88.
- Bisby, M.A., Tetzlaff, W., Brown, M.C., 1996. GAP-43 mRNA in mouse motoneurons undergoing axonal sprouting in response to muscle paralysis of partial denervation. *Eur. J. Neurosci.* 8, 1240-1248.
- Casoli, T., Di Stefano, G., Gracciotti, N., Fattoretti, P., Solazzi, M., Bertoni-Freddari, C., 2001. Age-related effects of moderate alcohol consumption on GAP-43 levels in rat hippocampus. *Mech. Ageing Dev.* 122, 1723-1738.

- Casoli, T., Di Stefano, G., Fattoretti, P., Delfino, A., Solazzi, M., Bertoni-Freddari, C., 2002. Effects of ethanol on GAP-43 levels in hippocampus and cerebellum of aged rats. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 973, 313-316.
- Chambon, P., 1996. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J.* 10, 940-954.
- Chiang, M.Y., Misner, D., Kempermann, G., Schikorski, T., Giguère, V., Sucov, H.M., Gage, F.H., Stevens, C.F., Evans, R.M., 1998. An essential role for retinoid receptors RAR $\beta$  and RXR $\gamma$  in long-term potentiation and depression. *Neuron* 21, 1353-1361.
- Chin, W.W., Yen, P.M., 1997. Molecular mechanisms of nuclear thyroid hormone action. In: Braverman, L.E., (editor). *Diseases of The Thyroid*. Humana Press, Totowa, pp 1–15
- Crabb, D.W., Pinairs, J., Hasanadka, R., Fang, M., Leo, M.A., Lieber, C.S., Tsukamoto, H., Motomura, K., Miyahara, T., Ohata, M., Bosron, W., Sanghani, S., Kedishvili, N., Shiraishi, H., Yokoyama, H., Miyagi, M., Ishii, H., Bergheim, I., Menzl, I., Parlesak, A., Bode, C., 2001. Alcohol and retinoids. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 25(5 Suppl ISBRA), 207S-217S.
- Eichenbaum, H., Fagan, A., Mathews, P., Cohen, N.J., 1988. Hippocampal system dysfunction odor discrimination learning in rats: impairment or facilitation depending on representational demands. *Behav. Neurosci.* 102, 331-339.
- Elias, P.K., Elias, M.F., D'Agostino, R.B., Silbershatz, H., Wolf, P.A., 1999. Alcohol consumption and cognitive performance in the Framingham Heart Study. *Am. J. Epidemiol.* 150(6), 580-589.
- Enderlin, V., Pallet, V., Alfos, S., Dargelos, E., Jaffard, R., Garcin, H., Higuieret, P., 1997a. Age-related decreases in mRNA for brain nuclear receptors and target genes are reversed by retinoic acid treatment. *Neurosci. Lett.* 229, 125-129.
- Enderlin, V., Alfos, S., Pallet, V., Garcin, H., Azais-Braesco, V., Jaffard, R., Higuieret, P., 1997b. 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, 629-632.
- Eravci, M., Pinna, G., Meinhold, H., Baumgartner, A., 2000. Effects of pharmacological and nonpharmacological treatments on thyroid hormone metabolism and concentrations in rat brain. *Endocrinology.* 141, 1027-1040.

- 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 signalling. *J. Neurosci.* 21, 6423-6429.
- Etchamendy, N., Enderlin, V., Marighetto, A., Pallet, V., Higuieret, P., Jaffard, R., 2003a. Vitamin A deficiency and relational memory deficit in adult mice: relationships with changes in brain retinoid signalling. *Behav. Brain Res.* 145, 37-49.
- Etchamendy, N., Desmedt, A., Cortes-Torrea, C., Marighetto, A., Jaffard, R., 2003b. Hippocampal lesions and discrimination performance of mice in the radial maze: sparing or impairment depending on the representational demands of the task. *Hippocampus.* 13,197-211.
- Kranklin, K.B.J., Paxinos, G., 1997. *The mouse brain in stereotaxic coordinates.* Academic press, San Diego.
- Gerendasy, D.D., Sutcliffe, J.G., 1997. RC3/neurogranin, a postsynaptic calpacitin for setting the response threshold to calcium influxes. *Mol. Neurobiol.* 15, 131-163.
- Grummer, M.A., Zachman, R.D., 2000. Interaction of ethanol with retinol and retinoic acid in RAR beta and GAP-43 expression. *Neurotoxicol. Teratol.* 22, 829-836.
- Guadaño-Ferraz, A., Escamez, M.J., Morte, B., Vargiu, P., Bernal, J., 1997. Transcriptional induction of RC3/neurogranin by thyroid hormone: differential neuronal sensitivity is not correlated with thyroid hormone receptor distribution in the brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 49, 37-44.
- Hulo, S., Alberi, S., Laux, T., Muller, D., Caroni, P., 2002. A point mutant of GAP-43 induces enhanced short-term and long-term hippocampal plasticity. *Eur. J. Neurosci.* 15, 1976-1982.
- 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, 191-198.
- 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. *Mol. Brain Res.* 123, 7-17.

- Iñiguez, M.A., Rodriguez-Peña, A., Ibarrola, N., Aguilera, M., Muñoz, A., Bernal, J., 1993. Thyroid hormone regulation of RC3, a brain-specific gene encoding a protein kinase-C substrate. *Endocrinology* 133, 467-473.
- Karimi-Abdolrezaee, S., Schreyer, D.J., 2002. Retrograde repression of growth-associated protein-43 mRNA expression in rat cortical neurons. *J. Neurosci.* 22, 1816-1822.
- Krazem, A., Mons, N., Higuieret, P., Jaffard, R., 2003a. Chronic ethanol consumption restores the age-related decrease in neurogranin mRNA level in the hippocampus of mice. *Neurosci. Lett.* 338, 62-66.
- Krazem, A., Marighetto, A., Higuieret, P., Jaffard, R., 2003b. Age-dependent effects of moderate chronic ethanol administration on different forms of memory expression in mice. *Behav. Brain Res.* 147, 17-29.
- Lebel, J.M., L'Herault, S., Dussault, J.H., Puymirat, J., 1993. Thyroid hormone up-regulates thyroid hormone receptor beta gene expression in rat cerebral hemisphere astrocyte cultures. *Glia* 9, 105-112.
- Lee, P.R., Brady, D., Koenig, J.I., 2003. Thyroid hormone regulation of N-Methyl-D-Aspartic Acid receptor subunit mRNA expression in adult brain. *J. Neuroendocrinol.* 15, 87-92.
- 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.
- Mangelsdorf, D.J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schutz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P., Evans, R.M., 1995. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83, 835-839.
- Marighetto, A., Etchamendy, N., Touzani, K., Torrea, C.C., Yee, B.K., Rawlins, J.N., Jaffard, R., 1999. Knowing which and knowing what: a potential mouse model for age-related human declarative memory decline. *Eur. J. Neurosci.* 11, 3312-3322.
- 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. USA* 98, 11714-11719.



- Mons, N., Enderlin, V., Jaffard, R., Higuieret, P., 2001. Selective age-related changes in the PKC-sensitive, calmodulin-binding protein, neurogranin, in the mouse brain. *J. Neurochem.* 79, 859-867.
- Mukamal, K.J., Kuller, L.H., Fitzpatrick, A.L., Longstreth, W.T. Jr, Mittleman, M.A., Siscovick, D.S. 2003. Prospective study of alcohol consumption and risk of dementia in older adults. *JAMA.* 289, 1405-1413.
- Orgogozo, J.M., Dartigues, J.F., Lafont, S., Letenneur, L., Commenges, D., Salamon, R., Renaud, S., Breteler, M.B., 1997. Wine consumption and dementia in the elderly: a prospective community study in the Bordeaux area. *Rev. Neurol. (Paris).* 153, 185-192.
- Pak, J.H., Huang, F.L., Li, J., Balschun, D., Reymann, K.G., Chiang, C., Westphal, H., Huang, K.P., 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. USA* 97, 11232-11237.
- Rhyner, T.A., Borbely, A.A., Mallet, J., 1990; Molecular cloning of forebrain mRNAs which is modulated by sleep deprivation. *Eur. J. Neurosci.* 2, 920-927.
- Ross, S.A., McCaffery, P.J., Drager, U.C., De Luca, L.M., 2000. Retinoids in embryonal development. *Physiol. Rev.* 80, 1021-1054.
- Routtenberg, A., Cantalops, I., Zaffuto, S., Serrano, .P, Namgung, U., 2000. Enhanced learning after genetic overexpression of a brain growth protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 7657-7662.
- Smith, J.W., Evans, A.T., Costall, B., Smythe, J.W., 2002. Thyroid hormones, brain function and cognition: a brief review. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 26, 45-60.
- Sporn, M.B., Roberts, A.B., Goodman, D.S., 1994. *The Retinoids: Biology, Chemistry, and Medicine.* 2nd ed. Raven Press, New York.
- Watson, J.B., Battenberg E.F., Wong, K.K., Bloom, F.E., Sutcliffe, J.G., 1990. Subtractive cDNA cloning of RC3, a rodent cortex-enriched mRNA encoding a novel 78 residue protein. *J. Neurosci. Res.* 26, 397-408.

Yamagata, T., Momoi, T., Kumagai, H., Nishikawa, T., Yanagisawa, M., Momoi, M., 1993. Distribution of retinoic acid receptor  $\beta$  proteins in rat brain: up-regulation by retinoic acid. *Biomed. Res.* 14, 183-190.

Yen, P.M., 2001. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol. Rev.* 81, 1097-142.

Zuccala, G., Onder, G., Pedone, C., Cesari, M., Landi, F., Bernabei, R., Cocchi, A.; Gruppo Italiano di Farmacoepidemiologia nell'Anziano Investigators., 2001. Dose-related impact of alcohol consumption on cognitive function in advanced age: results of a multicenter survey. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 25, 1743-1748.

## **Conclusion**

Les résultats de cette étude montrent que les animaux âgés soumis à une alcoolisation modérée <sup>1</sup> présentent une «atténuation» de l'hypoactivation des voies de signalisation de l'AR et de la T3 se traduisant au niveau de l'expression des récepteurs TR $\alpha$ / $\beta$  et RAR $\beta$  et au niveau de deux gènes cibles (GAP-43 et RC3). Par contre, dans ces mêmes conditions d'alcoolisation, les animaux adultes ne présentent plus d'augmentation du niveau d'activité de ces mêmes voies d'action.

Par ailleurs, la mémoire relationnelle/déclarative des souris a été évaluée sur un labyrinthe radial, dans le laboratoire de Neurosciences Cognitives. Les résultats de ces études montrent que les modifications des fonctions cognitives induites par l'alcool dépendent non seulement de l'âge des animaux, mais aussi des doses d'éthanol ingérées. En effet, par rapport à la dose d'alcool d'environ 13 g/kg/jour (éthanol 12%), la consommation modérée d'alcool à une dose d'environ 6 g/kg/jour (éthanol 6%) ne s'accompagne pas des effets délétères précédemment décrits chez les animaux adultes. Par contre, cette alcoolisation modérée maintient les effets bénéfiques observés sur les déficits cognitifs présentés par les animaux âgés.

L'ensemble de ces données biochimiques et comportementales montre qu'une consommation modérée d'alcool, chez un animal âgé, est susceptible de réinduire les voies de signalisation de la vitamine A et des hormones thyroïdiennes, et par voie de conséquences, d'améliorer certains déficits mnésiques associés au vieillissement.

Dans la suite de ce travail nous avons cherché à éprouver nos hypothèses chez l'Homme. Plus précisément, nous avons voulu déterminer les conséquences, d'une consommation chronique d'alcool sur l'activité des voies d'action des rétinoïdes et des hormones thyroïdiennes.

---

<sup>1</sup> Ethanol à 6% (volume/volume) apporté dans l'eau de boisson des animaux.



**CHAPITRE V**  
**CONSOMMATION D'ALCOOL ET EXPRESSION DES**  
**RECEPTEURS NUCLEAIRES DE L'ACIDE RETINOÏQUE ET**  
**DE LA TRIODOTHYRONINE DANS LES CELLULES**  
**MONONUCLEES DU SANG DE SUJETS AGES**



## **Chapitre V**

### **CONSOMMATION D'ALCOOL ET EXPRESSION DES RECEPTEURS NUCLEAIRES DE L'ACIDE RETINOÏQUE ET DE LA TRIODOTHYRONINE DANS LES CELLULES MONONUCLEES DU SANG DE SUJETS AGES**

Dans les chapitres précédants, nous avons mis en évidence, par une approche expérimentale, qu'une consommation modérée d'alcool s'accompagne d'une «atténuation» (éthanol 6%), voire de la suppression (éthanol 12%) de l'hypoexpression des voies d'action de l'acide rétinoïque et des hormones thyroïdiennes, dans le cerveau de souris âgées. Des études comportementales ont par ailleurs montré une amélioration des capacités mnésiques chez ces mêmes animaux (Krazem et coll., 2003a). Ces données nous amènent à suggérer qu'une consommation modérée d'alcool, chez l'animal âgé, s'accompagne de l'augmentation de l'activité des voies de signalisation des rétinoïdes et des hormones thyroïdiennes, *via* une augmentation de la biodisponibilité cellulaire de l'AR et de la T3.

Afin d'éprouver cette hypothèse chez l'homme nous avons, dans la suite de ce travail, étudié l'expression des récepteurs nucléaires l'AR et de la T3 dans les cellules mononucléées du sang de sujets âgés consommateurs ou non de boissons alcoolisées.

Les prélèvements de tissus, dans le cadre d'études biomédicales, sont très encadrés pour d'évidentes raisons éthiques. Le tissu sanguin constitue cependant un compartiment cellulaire facilement accessible par des méthodes non invasives. De plus, les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) expriment certains types de récepteurs nucléaires de l'AR (RAR $\alpha$ , RAR $\gamma$ , RXR $\alpha$ ) et de la T3 (TR $\alpha$  et TR $\beta$ ) (Williams et coll., 1989 ; Meier-Heusler et coll., 1995 ; Szabova et coll., 2003). L'intérêt physiologique de l'étude de ces récepteurs a été montré par plusieurs travaux qui ont mis en évidence une modification dans ces cellules des niveaux d'expression des récepteurs de l'AR et de la T3 en

réponse à des variations des statuts vitaminique A et thyroïdien (Williams et coll., 1989 ; Meier-Heusler et coll., 1995 ; Ballou et coll., 2003).

*Dans ce contexte, nous avons cherché à préciser si l'expression des récepteurs nucléaires dans les PBMC pouvait constituer chez l'homme un marqueur des modifications de l'activité des voies de signalisation de l'AR et de la T3, accompagnant une consommation chronique d'alcool. C'est pourquoi, nous avons mis en place, dans la dernière partie de ce travail, une approche biomédicale, destinée à quantifier l'expression des récepteurs nucléaires de l'AR et de la T3 dans les cellules mononucléées du sang de sujets âgés consommateurs ou non d'alcool.*

Les résultats de cette étude font l'objet de la publication 4.

### **Contexte de l'étude**

Cette étude s'inscrit dans le cadre d'une collaboration avec l'Equipe Vieillessement de l'Unité INSERM U593 dirigée par le Pr. JF. Dartigues. Nous avons eu accès à une sous-population de personnes âgées issues de la cohorte des Trois Cités (3C). L'objectif général de cette étude épidémiologique est d'estimer le risque de démence attribuable aux facteurs de risque (dont l'alimentation) et aux pathologies vasculaires, ainsi que l'effet de la réduction du risque vasculaire sur l'incidence et la prévalence de la démence. La cohorte 3C est constituée par 9809 personnes âgées de 65 ans et plus, recrutées sur les listes électorales de Bordeaux, Dijon et Montpellier. Chaque participant est suivi pendant quatre ans et examiné trois fois : à l'entrée dans l'étude, puis deux et quatre ans plus tard (The 3C Study Group, 2003). Lors de ces examens de nombreuses données sont recueillies permettant d'établir des bilans biologiques, cognitifs et nutritionnels.



## **Protocole expérimental**

Nous avons eu accès à une sous-population de 66 personnes âgées de 65 ans et plus, comprenant en 24 «témoins» non-buveurs, 10 buveurs occasionnels (1 à 7 verres/semaine), 12 buveurs modérés (8 à 21 verres/semaine), et 20 buveurs excessifs (plus de 21 verres/semaine).

A partir de prélèvements sanguins réalisés sur ces sujets, nous avons effectué (i) d'une part, un bilan biologique (rétinol, RBP, TTR, TSH, T3, T4, cholestérol, triglycérides, glycémie, ALAT, ASAT, GGT), (ii) et d'autre part, la quantification des ARNm des récepteurs de l'AR ( $RAR\alpha$ ,  $RAR\gamma$  et  $RXR\alpha$ ) et de la T3 ( $TR\alpha$  et  $TR\beta$ ) des cellules mononucléées du sang (PBMC).

## Principaux résultats

Les analyses biologiques effectuées dans le cadre de cette étude n'ont pas montré de modifications significatives des valeurs sériques du glucose, des triglycérides, du cholestérol, ou des enzymes hépatiques ALAT et ASAT, dans l'ensemble de cette population de personnes âgées, consommatrices ou non d'alcool. Nous avons néanmoins observé une corrélation positive entre les valeurs des GGT et la consommation d'alcool. Ce résultat est en accord avec les données de la littérature, qui présentent cette enzyme hépatique comme un bon marqueur biologique de la consommation d'alcool (revue dans Helander, 2003).

**Tableau IV : Paramètres sériques caractérisant les statuts vitaminique A et thyroïdien de la population étudiée.**

	<u>Abstinents</u>	<u>Buveurs modérés</u> (entre 1et 21verres/semaine)	<u>Buveurs excessifs</u> (>21verres/semaine)
<b><u>Rétinol</u></b> (µmol/l)	2,12 ± 0,08	2,19 ± 0,09	2,38 ± 0,12
<b><u>RBP</u></b> (µmol/l)	44,07 ± 1,63	42,00 ± 2,22	47,19 ± 2,81
<b><u>RBP/TTR</u></b> (mol/mol)	0,45 ± 0,01	0,46 ± 0,01	0,44 ± 0,01
<b><u>TTR</u></b> (µmol/l)	0,25 ± 0,01	0,24 ± 0,01	0,28 ± 0,01 *
<b><u>TSH</u></b> (µUI/ml)	2,74 ± 0,33	2,82 ± 0,38	2,20 ± 0,21
<b><u>fT3</u></b> (pmol/l)	3,38 ± 0,10	3,28 ± 0,06	3,45 ± 0,07
<b><u>fT4</u></b> (pmol/l)	13,32 ± 0,32	12,55 ± 0,37	13,72 ± 0,22 *

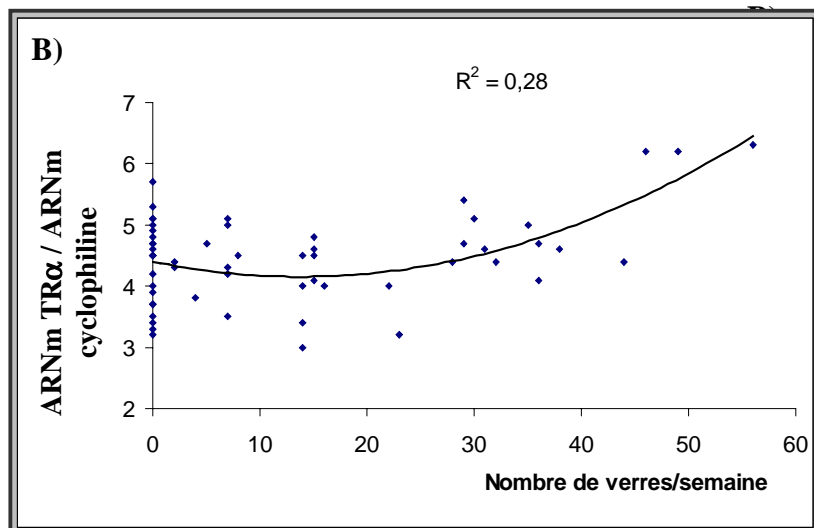
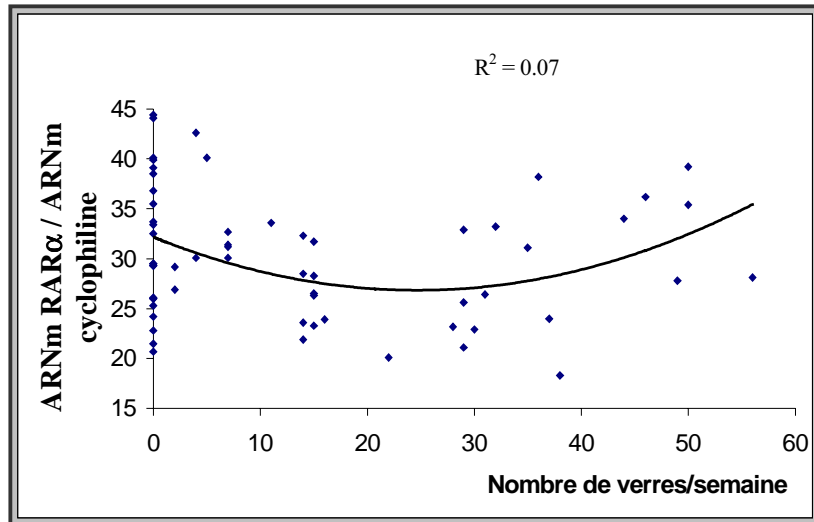
RBP: retinol binding protein ; TSH: thyroestimuline hypophysaire ; TTR: transthyréline ; fT3: triiodothyronine libre ; fT4: thyroxine libre

Les résultats sont donnés en moyenne ± s.e.m.

\* : différence significative entre les groupes de buveurs modérés et excessifs, p<0.05. Analyse de variance ANOVA, suivie du test LSD Fisher. Aucune autre variation significative n'a été mise en évidence suite à l'analyse statistique de ces résultats.

Nous n'avons pas mis en évidence de relations significatives entre la consommation d'alcool et les concentrations sériques de la vitamine A, des hormones thyroïdiennes et de leurs protéines de transport plasmatiques (**Tableau IV**). Néanmoins, nous avons observé d'une part une légère augmentation (+10%) de la concentration sérique de rétinol dans le groupe de consommateurs excessifs d'alcool par rapport aux sujets abstinents ou consommateurs modérés et d'autre part une augmentation significative de la concentration sérique de la TTR entre les groupes de buveurs excessifs et modérés. Les analyses biochimiques n'ont pas révélé de modifications significatives des taux sériques de la T3 libre et de la TSH, entre les différents groupes de sujets. Par contre, une augmentation significative de la concentration sérique de la T4 libre a été observée entre les groupes de consommateurs excessifs et modérés de boissons alcoolisées. D'autre part nous avons calculé pour chaque groupe le ratio RBP/TTR qui est couramment utilisé comme marqueur du statut nutritionnel (Rosales et Ross, 1998 ; Zago et coll., 2002). Ce ratio n'est pas affecté par la consommation d'alcool, ce qui tend à montrer que les sujets des différents groupes ont des apports nutritionnels satisfaisants.

En ce qui concerne la quantification des récepteurs de l'AR et de la T3 dans les PBMC, l'expression des isoformes  $RAR\gamma$ ,  $RXR\alpha$  et  $TR\beta$  n'est pas affectée chez les sujets consommateurs d'alcool. Par contre, nous avons observé des corrélations entre la consommation d'alcool et l'expression des récepteurs  $RAR\alpha$  et  $TR\alpha$ . Ces corrélations ne sont pas linéaires mais quadratiques : nous pouvons observer une légère baisse d'expression des ARNm de ces récepteurs dans les PBMC des consommateurs occasionnels d'alcool par rapport à la population témoin, et une augmentation de ces mêmes ARNm chez les sujets présentant une consommation plus élevée (à partir de 20-30 verres/semaine) (**figure 9**).



**Figure 9 : Corrélations entre le niveau d'expression des ARNm des récepteurs nucléaires RAR $\alpha$  (A) et TR $\alpha$  (B) dans les PBMC et la consommation d'alcool, chez des sujets âgés.**

**PUBLICATION 4**

**RELATIONSHIP BETWEEN LONG-TERM ALCOHOL CONSUMPTION AND  
RETINOIC ACID AND TRIODOTHYRONINE NUCLEAR RECEPTOR  
EXPRESSION IN MONONUCLEAR CELLS OF HEALTHY SUBJECTS**



**Relationship between long-term alcohol consumption and retinoic acid and triiodothyronine nuclear receptor expression in mononuclear cells of healthy human subjects.**

*(soumis à Alcoholism: Clinical and Experimental Research)*

Catherine Boucheron<sup>1</sup>, Serge Alfos<sup>1\*</sup>, Catherine Féart<sup>1</sup>, Luc Letenneur<sup>2</sup>, Denise Higuere<sup>3</sup>,  
Valérie Enderlin<sup>1</sup>, Jean-François Dartigues<sup>2</sup>, Véronique Pallet<sup>1</sup>, Paul Higuere<sup>1</sup>

**Acknowledgments**

The Three City Study is conducted under a partnership agreement between the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Victor Segalen – Bordeaux II University and the Sanofi-Synthelabo Company. The Fondation pour la Recherche Médicale funded the preparation and initiation of the study. The 3C-Study is also supported by the Caisse Nationale Maladie des Travailleurs Salariés, Direction Générale de la Santé, Conseils Régionaux of Aquitaine and Bourgogne, Fondation de France, Ministry of Research-INSERM Programme 'Cohortes et collections de données biologiques'.

## **ABSTRACT**

**Background:** Long-term alcohol consumption in human and animals has been associated with modifications in vitamin A and thyroid hormone metabolism. Vitamin A and thyroid hormone play a key role in gene expression through their nuclear receptors: retinoic acid receptors (RAR and RXR) and triiodothyronine receptors (TR). Previous data have shown that chronic alcohol consumption increases retinoic acid and triiodothyronine nuclear receptor mRNA levels in mouse liver and brain. However, little is known about the effects of alcohol consumption on the mRNA levels of these nuclear receptors in human subjects. Therefore, the present study was designed to investigate the effect of long-term alcohol consumption on RAR, RXR and TR mRNA expression in mononuclear cells of healthy human subjects.

**Methods:** Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) were obtained from an elderly sample of 42 healthy drinkers and 24 non-drinkers, drawn from a population-based study, the Three City Study. Vitamin A and thyroid hormone status was assessed by blood tests and the effects of long-term ethanol consumption on RAR $\alpha$ , RAR $\gamma$ , RXR $\alpha$ , TR $\alpha$ , TR $\beta$  mRNA levels were measured in PBMC using a real-time PCR method.

**Results:** Elderly drinkers did not display any significant alteration in vitamin A or thyroid hormone status. Moreover, nuclear receptor mRNA levels in PBMC were not significantly different between drinkers and non-drinkers. However, a correlation was observed between alcohol intake and RAR $\alpha$  and TR $\alpha$  mRNA expression in PBMC of healthy elderly subjects.

**Conclusions:** These results demonstrated for the first time that without any change in vitamin A or thyroid hormone status in healthy drinkers, a relationship exist between alcohol consumption and RAR $\alpha$  and TR $\alpha$  mRNA expression levels in PBMC from elderly subjects. It is concluded that PBMC could be used as effective markers of ethanol-induced modification in retinoic acid and triiodothyronine signalling pathways in healthy elderly subjects.

**Key Words:** retinoic acid nuclear receptors, triiodothyronine nuclear receptors, mononuclear cells, alcohol consumption, elderly.

**Running head:** RAR, RXR and TR mRNA levels in mononuclear cells of healthy drinkers



## INTRODUCTION

There are a large number of potential interactions between ethanol and nutrients (Seitz and Suter, 1994) or hormones (Emanuele and Emanuele, 1997). More particularly, it has been shown that chronic ethanol consumption can interfere with vitamin A and thyroid hormone metabolism. Indeed, it is well known that long-term alcohol intake, both in humans and animals, produces modifications in vitamin A and other metabolite levels in blood and in several organs (Crabb et al., 2001). Numerous studies have described thyroid dysfunction during long-term ethanol consumption in humans (Hermann et al., 2002) and altered activities of enzymes involved in thyroid hormone activation in rats (Baumgartner et al., 1994). Such interactions may be of major importance in physiological processes because vitamin A and thyroid hormones play a key role in gene expression through their nuclear receptors.

Vitamin A is a micronutrient with an unusually wide biological scope of action including morphogenesis, vision, reproduction, maintenance of differentiative functions, neuronal development and immune function (Sporn et al., 1994). Effects of vitamin A are mainly mediated through the binding of its active metabolite, retinoic acid (RA), to two families of nuclear receptors: RARs (receptors of all-*trans* and 9-*cis* retinoic acid stereoisomers) and RXRs (receptors specific to the 9-*cis* retinoic acid), both containing at least three isotypes designated  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ , encoded by separate genes (Chambon, 1996; Mangelsdorf et al., 1995). These receptors belong to the steroid/thyroid hormone nuclear receptor superfamily and function as ligand-dependent transcription factors by binding to retinoid response elements (RAREs) in the promoter of target genes (Bastien and Rochette-Egly, 2004). Because RXR is the heterodimeric partner of the nuclear receptor superfamily, retinoid signaling interacts closely with that of other members such as thyroid hormones (Chin and Yen, 1997).

Thyroid hormones are also involved in numerous functions such as growth, differentiation and metabolism. The thyroid signal is mediated by the binding of its active metabolite, triiodothyronine (T3), to nuclear receptors (TR $\alpha$  and TR $\beta$ ) that regulate gene expression (Yen, 2001).

The interactions of ethanol with vitamin A and thyroid hormones metabolism may lead to an altered expression of their own ligand-inducible nuclear receptors. Indeed, previous results suggest that, in mice, long-term ethanol consumption alters RA and T3

nuclear receptor expression in different organs (Alfos et al., 1996; Alfos et al., 2001; Pallet et al., 1993). However, in human healthy subjects, little is known about the effects of long-term alcohol consumption on RA and T3 nuclear receptor expression in spite of the broad ranging involvement of these transcription factors in signal transduction pathways. Blood constitutes a cellular compartment that can be readily accessed in healthy human subjects. Moreover, it is well known that peripheral blood mononuclear cells (PBMC) express TR $\alpha$  and TR $\beta$  and that the expression of these receptors is sensitive to thyroid status (Meier-Heusler et al., 1995; Williams et al., 1989). Recent data suggest that PBMC also express several members of RA nuclear receptors: RAR $\alpha$ , RAR $\gamma$ , RXR $\alpha$  and RXR $\beta$  (Royal et al., 2002; Szabova et al., 2003).

Because few human studies have been performed, the present work was undertaken to investigate the effect of long-term alcohol consumption on vitamin A and thyroid hormone status and on RA and T3 nuclear receptor expression (RAR $\alpha$ , RAR $\gamma$ , RXR $\alpha$ , TR $\alpha$  and TR $\beta$ ) in healthy human subjects.

## **SUBJECTS AND METHODS**

### **Subjects**

The subjects were selected from a large cohort, the Three City (3C) study. It is a collaborative research programme based on a cohort of 9294 subjects aged 65 years and over recruited in three French cities: Bordeaux, Dijon and Montpellier (The 3C Study Group, 2003). The cohort was randomly sampled from the electoral rolls and supplemented by volunteers. Baseline data collection included socio-demographic variables, medical history, blood pressure, anthropometrical data, and functional status, cognitive functioning and past and present consumption of tobacco, alcohol and drug use. Alcohol was recorded as the number of standard drinks consumed per week. A standard drink is equivalent to the ingestion of 10 g of pure alcohol. Among several psychometric tests, the Mini Mental Score Examination (MMSE) score (Folstein et al., 1975) was used to assess the global cognitive performance of the subjects. For the present study, 66 subjects, 24 non-drinkers and 42 drinkers, from the same area of Bordeaux were asked to give blood samples. This study was conducted in an elderly population where the alcohol consumption habits were well defined and stabilized for a long time, without any ethanol-related diseases according to a medical examination by a physician and the results of the blood test. The study protocol was approved by the Ethical Committee of the University Hospital of Kremlin-Bicêtre (Paris, France). Each participant signed an informed consent to participate in this study.

### **Blood sampling and analysis**

After an overnight fast, blood was collected from all subjects. Diagnostics kits (RIA and IRMA, Immunotech, Marseille, France) were used to measure plasma free triiodothyronine (fT3), free thyroxin (fT4) and thyroid stimulating hormone (TSH) concentrations. Plasma retinol concentration was assayed by high-pressure liquid chromatography according to the method of Leclercq and Bourgeay-Causse (1981). The measures of plasma transthyretin (TTR) and retinol binding protein (RBP) concentrations were performed by an immuno-nephelometric method using a Nephelometer Analyser II (Behring Diagnostics Inc., San Jose, CA). Serum glucose, triacylglycerol, cholesterol, GGT, ALAT, and ASAT were measured in blood samples by enzymatic methods using a Synchron

CX5 analyser (Beckman Coulter, Fullerton, CA). A part of the blood samples were recovered on anticoagulant tubes for blood mononuclear cell isolation.

### **Preparation of peripheral blood mononuclear cells (PBMC)**

Isolation of human blood mononuclear cells was performed by density gradient centrifugation using Ficoll-Plaque Plus solution (Amersham Biosciences, Orsay, France) according to the manufacturer's protocol. Briefly, 5 ml of anticoagulant-treated blood was layered on 4 ml of Ficoll-Plaque Plus solution and centrifuged at 400 g for 20 min at 20°C. Differential migration during centrifugation of different blood cell types resulted in the formation of layers on both sides of Ficoll-Plaque solution. Because of their low density the lymphocytes, monocytes and platelets were found at the interface between the plasma and the Ficoll-Plaque solution. This interface was collected and washed twice with 1 M PBS (pH 7.2) to remove platelets, Ficoll-Plaque and plasma. PBMC were then suspended in TRIzol Reagent for total RNA preparation.

### **Quantification of nuclear receptor mRNA expression**

#### **Total RNA extraction**

Blood mononuclear cells prepared from 5 ml of anticoagulant-treated blood were directly homogenized in 1 ml of TRIzol Reagent solution (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) and total RNA was extracted following the manufacturer's suggested protocol for small quantities of tissue. The integrity of the purified RNA was confirmed by formaldehyde-denaturing agarose gel electrophoresis. The quality and the concentration of RNA were determined by measurement of the  $UV_{260}/UV_{280}$  absorbance ratio. Average yield of total RNA extraction was not significantly different in PBMC from non-drinkers or drinkers.

#### **Reverse transcription and real-time PCR analysis**

Preparation of cDNA and mRNA quantification by real-time PCR (PCR assay involving the Light Cycler<sup>TM</sup> technology) was performed as described previously (Husson et al., 2003; Redonnet et al., 2002).

#### ***Reverse transcription***

The cDNA was synthesized with Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) according to the protocol recommended by the manufacturer with minor modifications. Briefly, 1 µg total RNA was incubated at 70° C for 10 min and then

placed on ice before addition of reverse transcriptase reaction reagents with a specific reverse primer (120 ng) in a final volume of 20  $\mu$ l. The reverse transcriptase reaction was performed at 42° C for 60 min. Parallel reactions for each RNA sample were run in the absence of reverse transcriptase to assess the degree of any contaminating genomic DNA.

### ***Analysis of gene expression using real-time polymerase chain reaction***

The cDNA quantification by real-time PCR was performed using a LightCycler system (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). To detect target-gene amplification products, LightCycler DNA Master SYBR Green I was used according to the manufacturer's instructions. The PCR reactions were performed in micro-capillary tubes in a final volume of 20  $\mu$ l containing 1X LC-DNA Master SYBR Green I mix, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5  $\mu$ M of each primer and 6  $\mu$ l cDNA. The amplification conditions were 95°C for 10 min to activate the polymerase, followed by forty cycles of denaturation at 95°C for 6 s, annealing at about 60°C (according to the gene studied) for 6 s, and elongation at 72°C for 10 s. After each elongation phase the fluorescence of SYBR Green I (a double-stranded DNA-binding dye) was measured and increasing amounts of PCR products were monitored from cycle to cycle. The forward and reverse primer sequences are shown in Table 1. Primers were purchased from Genset (Paris, France). For each primer pair used, melting curve analysis showed a single melting peak after amplification, indicating a specific product. The identity of amplified products was verified by sequencing with a Dye Terminator Reaction Cycle Kit (Perkin-Elmer, Norwalk, CT). They were then analysed on an ABI PRISM™ 377 automated DNA sequencer (Perkin-Elmer). Quantification data were analysed using the LightCycler analysis software, version 3.5 (Roche Diagnostics). In this analysis, the background fluorescence was removed by setting a noise band. The log-linear portion of the standard amplification curve was identified and the crossing point was the intersection of the best-fit line through the log-linear region and the noise band. The standard curve was a plot of the crossing point versus the amount of initial cDNA used for amplification. Cyclophilin and porphobilinogen deaminase (PBGD) cDNA were used as housekeeping for the relative cDNA quantification of [RAR $\alpha$ , RXR $\alpha$ , TR $\alpha$ ] and [RAR $\gamma$ , TR $\beta$ ], respectively. Standard curves were generated from 4-fold serial dilutions of target and housekeeping cDNA preparation.

The relationship between the crossing point and the initial amount of cDNA was found to be linear. The correlation coefficient (r) was 1 and PCR amplification efficiencies of

the target and the housekeeping gene were similar and close to 100 %. These standard curves were used to estimate the concentration of both the target and the housekeeping gene in each sample. The results were normalized by the ratio of the relative concentration of target to that of PBGD or cyclophilin sample. The real-time PCR method ensured that the expression levels of the housekeeping genes were unaffected by ethanol intake.

**Table 1: sequences of the primers used for the RT and real-time PCR quantification**

PCR primer pair	Reference	Sequences of forward (F) and reverse (R) primers	Position
PBGD	Raich et al., 1986	F : 5'-TGCACGATCCCGAGACTCTGC-3' R : 5'-GCACGGCTACTGGCACACTGC-3'	743-763 812-832
Cyclophilin	Haendler et al., 1987	F : 5'- TCCTAAAGCATAACGGGTCCTGGCAT-3' R : 5'- CGCTCCATGGCCTCCACAATATTCA-3'	280-304 421-445
RAR $\alpha$	Giguere et al., 1987	F : 5'-CTGCCAGTACTGCCGACTGC-3' R : 5'-ACGTTGTTCTGAGCTGTTGTTTCGTA-3'	519-538 729-753
RAR $\gamma$	Krust et al., 1989	F : 5'-CTGCCAGTACTGCCGGCTAC-3' R : 5'-TCTGCACTGGAGTTCGTGGTATACT-3'	837-856 1040-1064
RXR $\alpha$	Mangelsdorf et al., 1990	F98: 5'-CGACCCTGTCACCAACATTTGC-3' R : 5'-GAGCAGCTCATTCCAGCCTGCC-3'	861-882 981-1002
TR $\alpha$	Laudet et al., 1991	F : 5'-GTTCTAGATGACTCGAAGGCGGG-3' R : 5'-CTTCAGGAGTGGGCTCTGGTCG-3'	838-860 935-956
TR $\beta$	Weinberger et al., 1986	F : 5'-CCGAAGCACTGTCCAGACCGAGAAC-3' R : 5'-TCAAAGACTTCCAAGAAGAGAGGC-3'	334-358 399-423

The results were normalized by the ratio of the relative concentration of target to that of PBGD or cyclophilin sample. The real-time PCR method ensured that the expression levels of the housekeeping genes were unaffected by ethanol intake.

### **Statistical analysis**

Values are given as means and standard errors of the mean (SEM). The statistical significance of differences between means was calculated by Student's *t* test using StatGraphics Plus Software (Manugistics Inc., Rockville, MD). The *P* values < 0.05 were considered to be statistically significant.

A linear regression model was used to study the association between nuclear receptor expression and several explanatory variables. Analyses were performed using SAS software (SAS Institute Inc., Cary, NC).

## RESULTS

The sample was composed of 27 men and 39 women. The mean age of the subjects was 76.3 years (SD = 5.1 years). Three subjects were current smokers, and 41 had never smoked. Among the 24 non-drinkers, 18 (75 %) were women (Table 2). Half of the subjects were women among the 42 drinkers. Current smokers were all drinkers. The biological parameters presented in Table 2 were not significantly different between the two groups except, as expected, the mean  $\gamma$ -GT activity which was higher in drinkers than in non-drinkers ( $p < 0.02$ ). The positive correlation between  $\gamma$ -GT activity and the number of drinks per week ( $r = 0.80$ ,  $p < 0.0001$ ) strongly suggests that the declared alcohol consumption was accurate. Although, no statistically significant difference was observed for ALT activity between drinkers and non-drinkers, there was a positive correlation between ALT activity and ethanol consumption ( $r = 0.32$ ,  $p < 0.01$ ).

All hematological parameters were within the normal ranges for a healthy elderly population even the hepatic enzyme activity (ALT, AST and  $\gamma$ -GT) of the subjects who drink, suggesting that no liver disease was present.

### *Vitamin A and thyroid status in elderly drinkers*

Concerning vitamin A status, in the population studied, long-term alcohol consumption had no effect on plasma concentrations of vitamin A (retinol) and on the two plasmatic retinol transport proteins: RBP and TTR (Table 3). Moreover, the RBP/TTR ratio, which is considered to be a marker of vitamin A status, was not affected by alcohol consumption in elderly subjects. However, a slight but not significant increase in plasma retinol was observed in heavy drinkers ( $\geq 21$  drinks of alcohol per week) as compared to moderate (1 to 21 drinks of alcohol per week) or non-drinkers ( $2.38 \pm 0.12$ ,  $2.19 \pm 0.09$  and  $2.12 \pm 0.08$ , respectively for heavy, moderate and non-drinkers). No significant correlation was observed between alcohol consumption and vitamin A status parameters.

Thyroid status was also investigated in elderly drinkers and non-drinkers. The mean values of TSH, free T3 and T4, and TTR were similar between the two groups ( $p > 0.05$  for all parameters) and no significant correlation was observed between alcohol consumption and TSH, T3, T4 or TTR plasmatic values. The biological parameters concerning vitamin A and thyroid hormone status were within the normal ranges for a healthy elderly population.



**Table 2: Descriptive and biological characteristics of the subjects included in the study**

	<u>Non-drinkers<sup>a</sup></u>		<u>Drinkers<sup>a</sup></u>	
	(n=24)		(n=42)	
<b>Age</b> (years)	75.62 ± 1.28	(69-90)	76.66 ± 0.64	(70-90)
<b>Sex</b> (Male/Female)	6/18		21/21	
<b>Alcohol intake</b> (drinks/week)	0		22.78 ± 2.24	(2-56)
<b>Current smokers</b>	0		3	
<b>γ-GT</b> (Units/liter)	18.14 ± 1.67		24.49 ± 10.42 *	
<b>AST</b> (Units/liter)	20.23 ± 0.97		20.23 ± 0.68	
<b>ALT</b> (Units/liter)	22.04 ± 1.49		22.50 ± 1.19	
<b>Glucose</b> (mmol/liter)	4.82 ± 0.17		4.91 ± 0.12	
<b>Total cholesterol</b> (mmol/liter)	5.59 ± 0.20		5.42 ± 0.13	
<b>Triacylglycerol</b> (mmol/liter)	1.07 ± 0.09		1.14 ± 0.06	

<sup>a</sup> data are expressed as number or mean ± s.e.m and range.

γ-GT: γ-glutamyl transferase; AST: aspartate aminotransferase; ALT: alanine amino transferase  
Statistical analyses were performed by using Student's *t* test, and *p* < 0.05 was considered statistically significant. \* *p* < 0.02 versus non-drinkers subjects.

**Table 3: Plasma concentrations of vitamin A, thyroid hormones and transport proteins, in alcohol drinkers and non-drinkers**

	<u>Non-drinkers</u>		<u>Drinkers</u>	
	(n=24)		(n=42)	
	mean ± s.e.m.	range	mean ± s.e.m.	range
<b>Retinol</b> (μmol/liter)	2.12 ± 0.08	(1.6-3.1)	2.28 ± 0.07	(1.4-3.5)
<b>RBP</b> (mg/liter)	44.07 ± 1.63	(33.4-64.3)	44.54 ± 1.80	(16.5-76.8)
<b>TTR</b> (g/liter)	0.25 ± 0.01	(0.18-0.35)	0.26 ± 8.42	(0.11-0.42)
<b>RBP/TTR</b> (mol/mol)	0.46 ± 0.01	(0.36-0.67)	0.45 ± 0.01	(0.33-0.60)
<b>ft3</b> (pmol/liter)	3.38 ± 0.10	(1.9-4.4)	3.37 ± 0.05	(2.8-4.0)
<b>ft4</b> (pmol/liter)	13.32 ± 0.32	(10.6-16.6)	13.12 ± 0.23	(10.1-16.2)
<b>TSH</b> (μIUnits/ml)	2.74 ± 0.33	(0.15-5.57)	2.52 ± 0.22	(0.13-7.92)

RBP: Retinol Binding Protein; TTR: Transthyretin; ft3: free triiodothyronine; ft4, free thyroxin;  
TSH: thyroid stimulating hormone

Statistical analyses were performed by using Student's *t* test, and *p* < 0.05 was considered statistically significant.

**Table 4: Effect of alcohol consumption on the relative mRNA expression of RA and T3 nuclear receptors in human PBMC**

	Non-drinkers (n=24)		Drinkers (n=42)	
	mean $\pm$ s.e.m.	range	mean $\pm$ s.e.m.	range
<b>RAR<math>\alpha</math></b> (% Cyclophilin)	31.66 $\pm$ 1.49	(20.7-44.4)	29.65 $\pm$ 0.95	(18.3-42.6)
<b>RAR<math>\gamma</math></b> (% PBGD)	169.74 $\pm$ 8.20	(100-253)	164.66 $\pm$ 4.48	(110-219)
<b>RXR<math>\alpha</math></b> (% Cyclophilin)	28.44 $\pm$ 1.20	(20-40.2)	31.46 $\pm$ 1.24	(15.9-46.6)
<b>TR<math>\alpha</math></b> (% Cyclophilin)	4.38 $\pm$ 0.15	(3.2-5.7)	4.56 $\pm$ 0.12	(3.0-6.3)
<b>TR<math>\beta</math></b> (% PBGD)	10.19 $\pm$ 0.60	(6.2-14.8)	9.02 $\pm$ 0.44	(4.7-14.3)

PBGD: porphobilinogen deaminase

Statistical analyses were performed by using Student's *t* test, and  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

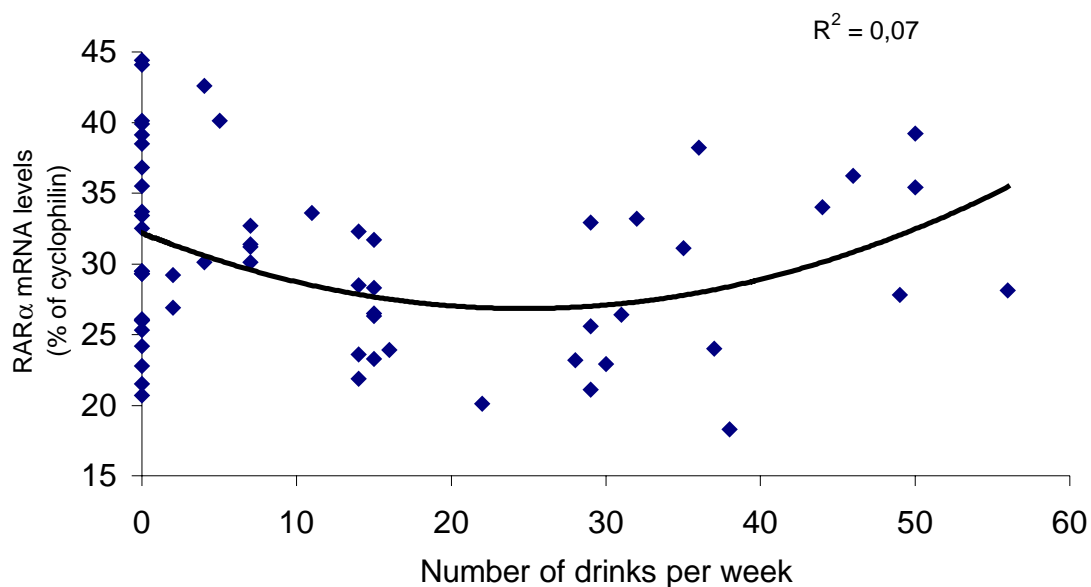
Table 4 shows the relative mRNA levels of RA and T3 nuclear receptors expressed in drinker's and non-drinker's PBMC. No significant difference was observed in RA and T3 nuclear receptor mRNA expression between drinkers and non-drinkers. For instance, RAR $\alpha$  expression in PBMC was similar in both groups ( $p < 0.14$ ) and a higher variability among non-drinkers was observed. Because the drinker population was not homogenous and there was a wide range of alcohol intake (from 2 to 56 drinks per week), a linear regression model was used to test the association between nuclear receptor expression and a quadratic function of the number of drinks per week (i.e. number of drinks + number of drinks squared). Using this model, alcohol consumption was significantly associated with RAR $\alpha$  mRNA expression in PBMC ( $p < 0.037$ ) as shown in Figure 1. Both factors (number of drinks + number of drinks squared) were significantly associated ( $p < 0.01$  and  $p < 0.02$ , respectively) and confirmed the quadratic association between RAR $\alpha$  expression and alcohol consumption. When alcohol consumption was adjusted for several potential confounders such as sex or MMSE, the relation remained significant. Sex and MMSE score were not significantly associated with RAR $\alpha$  mRNA expression in PBMC ( $p < 0.41$  and  $p < 0.68$ , respectively).

TR $\alpha$  mRNA expression in PBMC was significantly associated with alcohol consumption ( $p < 0.0001$ ). Here again, a quadratic association was found (number of drinks,  $p < 0.049$ ; number of drinks squared,  $p < 0.001$ ). The association was still significant ( $p <$

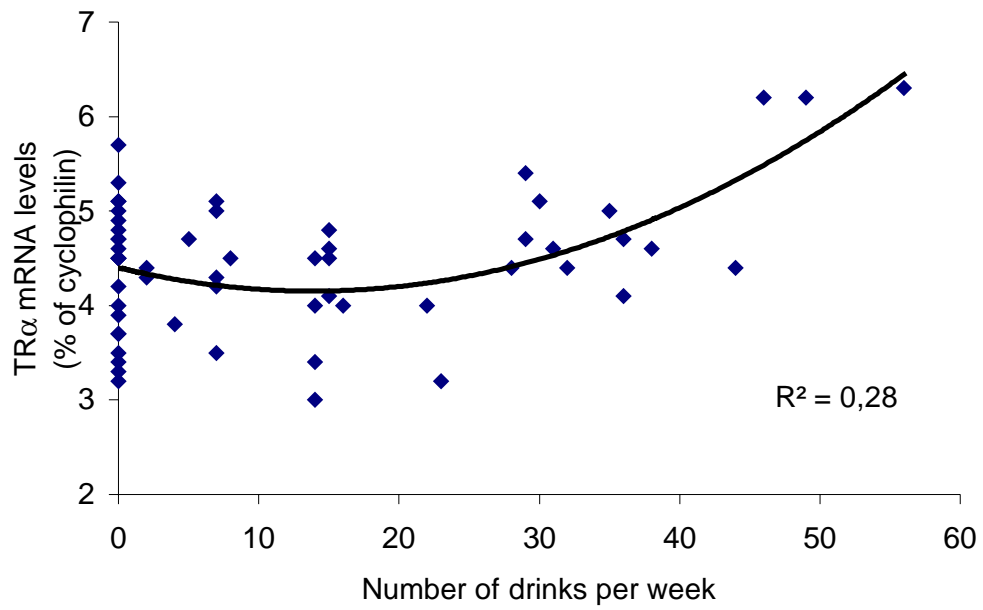
0.0006) when adjusted for sex and MMSE score. As shown in Figure 2, TR $\alpha$  mRNA level seemed to increase in PBMC above 20-30 drinks per week.

There was also a significant association between RXR $\alpha$  mRNA expression and alcohol consumption ( $p < 0.04$ ). However, when adjusted for sex, the association disappeared ( $p < 0.25$ ). As RXR $\alpha$  is associated with sex ( $p < 0.048$ ), the previous results were mainly explained by the differential distribution of men between drinkers and non-drinkers.

Using this quadratic model, there was no significant association between RAR $\gamma$  or TR $\beta$  mRNA expression in PBMC and alcohol consumption ( $p < 0.34$  and  $p < 0.26$  for RAR $\gamma$  and TR $\beta$  respectively).



**Fig. 1. Relationship between RAR $\alpha$  mRNA expression in PBMC and alcohol intake in elderly subjects.**



**Fig. 2. Relationship between TRα mRNA expression in PBMC and alcohol intake in elderly subjects.**

## DISCUSSION

The present study was conducted to investigate, in healthy human subjects, the effect of long-term alcohol consumption on vitamin A and thyroid hormone status and, for the first time, on their nuclear receptor mRNA levels in PBMC.

First of all, concerning vitamin A status, in the present study drinkers did not display any significant alteration in serum retinol and RBP levels as compared with non-drinkers. Moreover, the RBP/TTR ratio was not affected by alcohol consumption in elderly subjects and this ratio was higher than 0.37 in the whole population studied which indicate a sufficient vitamin A status (Zago et al., 2002). Nevertheless, a slight non-significant increase in serum retinol concentration appeared in elderly subjects drinking more than 21 drinks of alcohol per week as compared with abstinent subjects. Several studies have shown in middle-aged and elderly (65 years old and over) non-alcoholic subjects that alcohol consumption is associated with an increase in serum retinol (Guilland et al., 1994; Walmsley et al., 1998). However, these results were obtained with a larger number of subjects than in our studies (more than 150). By contrast, studies conducted in alcoholic subjects, with liver diseases, generally showed no effect of alcohol abuse on serum retinol and RBP concentrations despite a severe reduction in hepatic vitamin A stores (Leo and Lieber, 1999). In animals, it has been showed that an acute non-lethal ethanol administration in rats increases serum vitamin A and RBP concentrations (Sato and Lieber, 1982). Taken together, these data pointed out differential effects of ethanol on serum retinol and RBP concentrations according to the quantity of alcohol consumed and the presence of liver diseases.

Secondly, concerning thyroid status, the present data showed similar TSH, T3 and T4 serum concentrations between elderly drinkers and non-drinkers. Whereas several studies have described thyroid dysfunction in alcoholism, the effects of alcohol consumption on TSH, T3 and T4 serum concentrations still remain controversial (Hermann et al., 2002). Because all of these studies concern alcoholic subjects after an abstinence period, and often with liver diseases, they could not be related to the present data.

The present results indicate that in elderly subjects, alcohol consumption has no significant effect on vitamin A or thyroid hormone serum concentrations. However, these parameters did not reflect the nuclear bioavailability of their active metabolites (RA and T3) at the nuclear level in PBMC. Indeed, Berggren-Söderlund et al. (2003) demonstrated that plasma retinol appears to be a poor indicator of the concentration of the active metabolite *all-*

trans retinoic acid in serum from healthy individuals and obese subjects submitted to severe caloric restriction. The originality of the present investigation was to measure, by real-time PCR, the effect of long-term alcohol consumption on the mRNA expression of RA and T3 nuclear receptors in PBMC, which may be markers of RA and T3 bioavailability at the cellular level.

The original finding of this study was a significant association between alcohol intake and RAR $\alpha$  and TR $\alpha$  mRNA expression levels in PBMC of elderly healthy subjects, without any ethanol-related modification in other RA and T3 nuclear receptors mRNA (i.e. RAR $\gamma$ , RXR $\alpha$  and TR $\beta$ ). These results were not explained by confounding factors studied such as sex, MMSE or cigarette smoking. These correlations were non-linear as light drinkers displayed light decreases or no modification in RAR $\alpha$  and TR $\alpha$  mRNA levels whereas moderate and excessive drinkers ( $\geq 30$  drinks/week) displayed an increase in the expression patterns of these receptors. The present results may be related to numerous epidemiological data pointed out U- or J-shape relationship between alcohol consumption and mortality (San Jose, 2003) or between alcohol consumption and risk of dementia (Mukamal et al., 2003; Orgogozo et al, 1997). To our knowledge, this is the first evidence of a relationship between alcohol consumption and RA and T3 nuclear receptor expression in PBMC. Indeed, very few studies have investigated the effect of alcohol consumption on RA and T3 nuclear receptors in humans. Williams et al. (1989) have measured TR mRNA expression in peripheral mononuclear cells of patients with liver diseases some of whom with liver cirrhosis. These authors showed, by northern blot, an increase in both TR $\alpha$  and TR $\beta$  mRNA levels in PBMC and liver biopsies of patients with liver diseases. Presently, there is no information available concerning the effects of alcohol on RA nuclear receptors in human PBMC.

On the other hand, several studies have already been conducted in animals concerning the effects of ethanol consumption on RA and T3 nuclear receptors mRNA levels and have demonstrated different results according to the method of alcohol administration, organs studied and the age of animals. Long-term ethanol consumption (ethanol 12% (v/v) for 10 months) induces overexpression of RAR $\beta$  and TR $\alpha\beta$  mRNA in adult mouse liver (Pallet et al., 1993) and brain (Alfos et al., 1996; Alfos et al., 2001). However, Wang et al., (1998) have shown, using a Lieber-DeCarli alcohol diet, over a 1-month period, that RAR expression in adult rat liver was unaffected. Furthermore, recent studies have been conducted to determine the combined effect of ethanol consumption and aging on RA and T3 nuclear receptor expression, in mouse brain. Results showed that 5 months of ethanol consumption

(12% (v/v)) reduces the age-related hypoexpression of TR $\alpha$  $\beta$  and RAR $\beta$  in aged mouse brain (Alfos et al., 2002).

The alcohol-related increase in RA and T3 nuclear receptors mRNA observed in animal studies and in the present one, conducted in human, suggests increased RA and T3 nuclear bioavailability in that it is well known that the expression of these receptors is regulated by their own ligands (Husson et al., 2004; Kato et al., 1992; Sadow et al., 2003). It is also well known that ethanol consumption interferes with retinoic acid biosynthesis pathways. Indeed, it has been shown (i) that enzymes involved in retinoic acid synthesis pathways are stimulated by ethanol (Boerman and Napoli, 1996), (ii) an increase in brain RA synthesis in ethanol-treated rats (Ullman et al., 1998), (iii) an ethanol-induced mobilization of retinol from the liver to other organs (Frank et al., 1976). Moreover, concerning the effects of ethanol on thyroid hormone metabolic pathways, an ethanol-induced stimulation of type II iodothyronine 5' deiodinase in rat brain (Baumgartner et al., 1997) and type I iodothyronine 5' deiodinase in rat liver (Nikodémová et al., 1998) has been demonstrated. These enzymes catalyze the deiodination of thyroxin (T4) to the 'metabolically active' T3.

All together, these data suggest that the relationship between alcohol consumption and RAR $\alpha$  and TR $\alpha$  mRNA expression level in elderly human PBMC may result from alteration in RA and T3 nuclear bioavailability in these cells. A recent investigation demonstrating the responsiveness of mononuclear blood cells to vitamin A status supports this hypothesis. Indeed, *in vitro* B-cell clones derived from peripheral blood B cells displayed induction of RAR $\alpha$ 2 mRNA expression without any alteration in constitutive expression of RAR $\alpha$ 1 following RA administration (Ballow et al., 2003). Moreover, the RAR $\alpha$ 2 gene is directly up-regulated by RA through a conserved RARE (Leroy et al., 1991). Thus, it could be suggested that the relationship between RAR $\alpha$  expression level and alcohol intake is consecutive to an ethanol-induced increase in RA bioavailability. Furthermore, findings showed no significant effect of RA on RAR $\gamma$  level in human tissues (Ballow et al., 2003). These results are consistent with the present observation showing that PBMC from drinker subjects did not display any significant modification in RAR $\gamma$  expression levels. In case of RXR, the present data show unchanged mRNA expression levels of RXR $\alpha$  in the PBMC of drinkers as compared with non-drinkers. Ligand-dependent regulation of RXR $\alpha$  expression seems to vary from cells to cells (Nomura et al., 1999).

Investigations have also reported responsiveness of mononuclear blood cells to thyroid status. The quantification of TR mRNA in human lymphocytes indicated a decrease

in TR $\beta$ 1 expression level in blood from hyperthyroid subjects versus euthyroid subjects (Meier-Heusler et al., 1995). Moreover, hypothyroidism is associated with a significant increase in nuclear T3 maximal binding capacity, whereas this binding capacity is unaltered in hyperthyroid patients (Kvetny et al., 1989; Li et al., 1990). Furthermore, in agreement with the present results, differential regulation of TR $\alpha$  and  $\beta$  isoforms by thyroid hormones has already been demonstrated in different tissues (Sadow et al., 2003).

In summary, the present study demonstrated a relationship between alcohol consumption and RAR $\alpha$  and TR $\alpha$  mRNA expression in PBMC from elderly subjects in spite of no change in vitamin A or thyroid hormone status in healthy drinkers. This is the first investigation reporting that peripheral mononuclear cells can be used as effective markers of ethanol-induced modification in RA and T3 signalling pathways in healthy elderly subjects. It remains to determine whether such modification in RA and T3 nuclear receptor expression induced by ethanol consumption in PBMC may be link with physiological process.



## REFERENCES

- Alfos S, Boucheron C, Pallet V, Higuieret D, Enderlin V, Beracochea D, Jaffard R, Higuieret 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* 25:1506-1514.
- Alfos S, Higuieret P, Pallet V, Higuieret D, Garcin H, Jaffard R (1996) Chronic ethanol consumption increases the amount of mRNA for retinoic acid and triiodothyronine receptors in mouse brain. *Neurosci Lett* 206:73-76.
- Alfos S, Krazem A, Pallet V, Higuieret D, Enderlin V, Beracochea D, Jaffard R, Higuieret P (2002) Effects of ethanol consumption on the expression of retinoic acid and triiodothyronine nuclear receptors and on cognitive performance during aging (abstract). *Alcohol Clin Exp Res (Suppl 5)* 25:107A.
- Ballow M, Wang X, Xiang S, Allen C (2003) Expression and regulation of nuclear retinoic acid receptors in human lymphoid cells. *J Clin Immunol* 23:46-54.
- Bastien J, Rochette-Egly C (2004) Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. *Gene* 328:1-16.
- Baumgartner A, Heyne A, Campos-Barros A, Kohler R, Muller F, Meinhold H, Rommelspacher H, Wolffgramm J (1994) Hypothalamic-pituitary-thyroid axis in chronic alcoholism. II. Deiodinase activities and thyroid hormone concentrations in brain and peripheral tissues of rats chronically exposed to ethanol. *Alcohol Clin Exp Res* 18:295-304.
- Baumgartner A, Eravci M, Pinna G, Hiedra L, Prengel H, Brodel O, Meinhold H (1997) Thyroid hormone metabolism in the rat brain in an animal model of 'behavioral dependence' on ethanol. *Neurosci Lett* 227:25-28.
- Berggren-Söderlund M, Fex G, Nilsson-Ehle P (2003) Decreasing serum concentrations of all-trans, 13-cis retinoic acids and retinol during fasting and caloric restriction. *J Intern Med* 253:375-380.
- Boerman MH, Napoli JL (1996) Cellular retinol-binding protein-supported retinoic acid synthesis. Relative roles of microsomes and cytosol. *J Biol Chem* 271:5610-5616.
- Chambon P (1996) A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J* 10:940-954.
- Chin WW, Yen PM (1997) Molecular mechanisms of nuclear thyroid hormone action, in *Contemporary Endocrinology: Disease of the Thyroid* (Braverman LE ed.), pp 1-15. Humana Press Inc., Totowa.
- Crabb DW, Pinairs J, Hasanadka R, Fang M, Leo MA, Lieber CS, Tsukamoto H, Motomura K, Miyahara T, Ohata M, Bosron W, Sanghani S, Kedishvili N, Shiraishi H, Yokoyama H, Miyagi M, Ishii H, Bergheim I, Menzl I, Parlesak A, Bode C (2001) Alcohol and retinoids. *Alcohol Clin Exp Res (Suppl 5)* 25:207S-217S.
- Emanuele N, Emanuele MA (1997) The endocrine system: alcohol alters critical hormonal balance. *Alcohol Health Res World* 21:65-75.

Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR (1975) "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res* 12:189-198.

Frank O, Luisada-Opper A, Sorrell MF, Zetterman R, Baker H (1976) Effects of a single intoxicating dose of ethanol on the vitamin profile of organelles in rat liver and brain. *J Nutr* 106:606-614.

Giguere V, Ong ES, Segui P, Evans RM (1987) Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid. *Nature* 330:624-629.

Guilland JC, Costa de Carvalho MJ, Moreau D, Boggio V, Lhuissier M, Fuchs F (1994) Interrelationships of alcohol intake with blood vitamin status in nonalcoholic subjects. *Nutr Res* 14:1317-1330.

Haendler B, Hofer-Warbinek R, Hofer E (1987) Complementary DNA for human T-cell cyclophilin. *EMBO J* 6:947-950.

Hermann D, Heinz A, Mann K (2002) Dysregulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis in alcoholism. *Addiction* 97:1369-1381.

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. *Mol Brain Res* 123:7-17.

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* 286:755-760.

Krust A, Kastner P, Petkovich M, Zelent A, Chambon P (1989) A third human retinoic acid receptor, hRAR-gamma. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:5310-5314.

Kvetny J, Matzen LE, Blichert-Toft M, Watt-Boolsen S, Date J (1989) Nuclear thyroid hormone receptor binding in human mononuclear blood cells after goitre resection. *Horm Metab Res* 21:142-144.

Laudet V, Begue A, Henry-Duthoit C, Joubel A, Martin P, Stehelin D, Saule S (1991) Genomic organization of the human thyroid hormone receptor alpha (c-erbA-1) gene. *Nucleic Acids Res* 19:1105-1112.

Leclercq M, Bourgeay-Causse M (1981) Une méthode simple, fiable, rapide: dosage simultané du rétinol et du tocophérol sériques par chromatographie liquide haute performance *Rev Inst Pasteur Lyon* 14:475-496.

Leo MA, Lieber CS (1999) Alcohol, vitamin A, and beta-carotene: adverse interactions, including hepatotoxicity and carcinogenicity. *Am J Clin Nutr* 69:1071-1085.

Leroy P, Nakshatri H, Chambon P (1991) Mouse retinoic acid receptor alpha 2 isoform is transcribed from a promoter that contains a retinoic acid response element. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:10138-10142.

Li DQ, Kuang AK, Ding T, Chen JL, Xu MY (1990) Nuclear 3,5,3'-triiodothyronine receptors (T3R) of circulating human lymphocytes in hyper- and hypothyroidism and nonthyroidal diseases. *Chin Med J (Engl)* 103:355-358.

Mangelsdorf DJ, Ong ES, Dyck JA, Evans RM (1990) Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway. *Nature* 345:224-229.

Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM (1995) The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83:835-839.

Meier-Heusler S, Pernin A, Liang H, Goumaz MO, Burger AG, Meier CA (1995) Quantitation of beta 1 triiodothyronine receptor mRNA in human tissues by competitive reverse transcription polymerase chain reaction. *J Endocrinol Invest* 18:767-773.

Mukamal KJ, Kuller LH, Fitzpatrick AL, Longstreth WT Jr, Mittleman MA, Siscovick DS (2003) Prospective study of alcohol consumption and risk of dementia in older adults. *JAMA* 289:1405-1413.

Nikodemova M, Benicky J, Brtko J, Strbak V (1998) Chronic ethanol drinking and food deprivation affect rat hypothalamic-pituitary-thyroid axis and TRH in septum. *Endocrine* 9:213-218.

Nomura Y, Nagaya T, Hayashi Y, Kambe F, Seo H (1999) 9-cis-retinoic acid decreases the level of its cognate receptor, retinoid X receptor, through acceleration of the turnover. *Biochem Biophys Res Commun* 260:729-733.

Orgogozo JM, Dartigues JF, Lafont S, Letenneur L, Commenges D, Salamon R, Renaud S, Breteler M (1997) Wine consumption and dementia in the elderly: a prospective community study in the Bordeaux area. *Rev Neurol*, 153: 185-192.

Pallet V, Coustaut M, Naulet F, Higuieret D, Garcin H, Higuieret P (1993) Chronic ethanol administration enhances retinoic acid and triiodothyronine receptor expression in mouse liver. *FEBS Lett* 331:119-122.

Raich N, Romeo PH, Dubart A, Beaupain D, Cohen-Solal M, Goossens M (1986) Molecular cloning and complete primary sequence of human erythrocyte porphobilinogen deaminase. *Nucleic Acids Res* 14:5955-5968.

Redonnet A, Bonilla S, Noel-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 Relat Metab Disord* 26:920-927.

Sadow PM, Chassande O, Koo EK, Gauthier K, Samarut J, Xu J, O'Malley BW, Weiss RE (2003) Regulation of expression of thyroid hormone receptor isoforms and coactivators in liver and heart by thyroid hormone. *Mol Cell Endocrinol* 203:65-75.

San Jose B (2003) Alcohol consumption and mortality: comparison between countries and meta-analyses. *Eur J Epidemiol* 18:603-605.

Sato M, Lieber CS (1982) Changes in vitamin A status after acute ethanol administration in the rat. *J Nutr* 112:1188-1196.

Seitz HK, Suter P (1994) Ethanol toxicity and nutritional status, in *Nutritional Toxicology* (Kotsonis FN, Mackey M, Hjelle JH eds), pp 97-115. Raven Press, New York.

Sporn, MB, Roberts AB, Goodman DS (1994) *The Retinoids: Biology, Chemistry, and Medicine*. 2nd ed. Raven Press, New York.

Szabova L, Macejova D, Dvorcakova M, Mostbock S, Blazickova S, Zorad S, Walrand S, Cardinault N, Vasson MP, Rock E, Brtko J (2003) Expression of nuclear retinoic acid receptor in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of healthy subjects. *Life Sci* 72:831-836.

The 3C study group (2003) Vascular factors and risk of dementia: design of the three-city study and baseline characteristics of the study population. *Neuroepidemiology* 22:316-325.

Ullman MD, McCaffery P, Evans J, Koul O, McCluer RH (1998) Ethanol increases cerebellar and decreases cortical retinoic acid concentration of postnatal rat brain (abstract). *Alcohol Clin Exp Res* 22:55A.

Walmsley CM, Bates CJ, Prentice A, Cole TJ (1998) Relationship between alcohol and nutrient intakes and blood status indices of older people living in the UK: further analysis of data from the National Diet and Nutrition Survey of people aged 65 years and over 1994/5. *Public Health Nutr* 1:157-167.

Wang XD, Liu C, Chung J, Stickel F, Seitz HK, Russell RM (1998) Chronic alcohol intake reduces retinoic acid concentration and enhances AP-1 (c-Jun and c-Fos) expression in rat liver. *Hepatology* 28:744-750.

Weinberger C, Thompson CC, Ong ES, Lebo R, Gruol DJ, Evans RM (1986) The c-erb-A gene encodes a thyroid hormone receptor. *Nature* 324:641-646.

Williams GR, Franklyn JA, Neuberger JM, Sheppard MC (1989) Thyroid hormone receptor expression in the "sick euthyroid" syndrome. *Lancet* 2:1477-1481.

Yen PM (2001) Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev* 81:1097-1142.

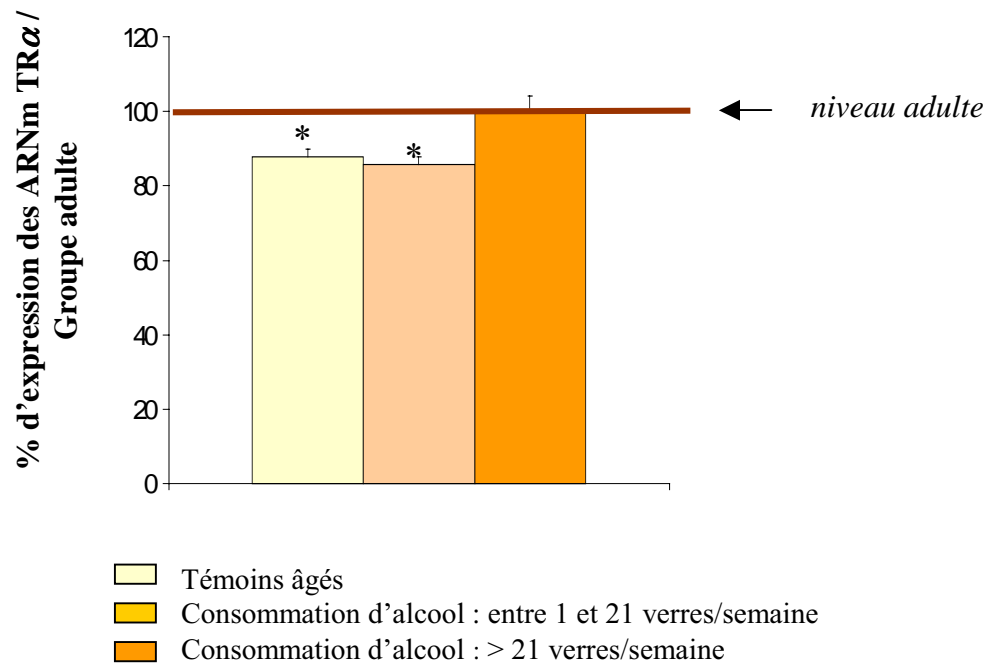
Zago LB, Dupraz H, Sarchi MI, Rio ME (2002) The molar ratio of retinal-binding protein to transthyretin in the assessment of vitamin A status in adults. Proposal of a cut-off point. *Clin Chem Lab Med* 40: 1301-1307.

## **Conclusion**

Les résultats de cette étude mettent en évidence une corrélation faible mais néanmoins significative entre l'expression des ARNm des récepteurs RAR $\alpha$  et la consommation d'alcool, et une corrélation plus nette entre l'expression des ARNm des TR $\alpha$  et la quantité d'alcool ingérée.

Par ailleurs, une autre étude réalisée au laboratoire a permis d'évaluer les effets du vieillissement sur l'expression des ARNm des récepteurs de l'AR et de la T3, dans les PBMC. Les résultats montrent notamment une diminution significative de l'expression des ARNm des récepteurs TR $\alpha$ , et une tendance à la diminution des ARNm des RAR $\alpha$ . Ces hypoexpressions, en accord avec les résultats obtenus chez l'animal (Enderlin et coll., 1997a ; Enderlin et coll., 1997b ; Etchamendy et coll., 2001), confortent notre hypothèse d'une diminution avec l'âge de la biodisponibilité intracellulaire de l'AR et de la T3. Dans ce contexte, il nous a semblé intéressant de savoir si, chez des sujets âgés, l'alcool était susceptible d'augmenter l'expression des ARNm des récepteurs TR $\alpha$  et RAR $\alpha$  et ainsi s'opposer à leur hypoexpression au cours du vieillissement. Nos résultats montrent une suppression de l'hypoexpression des ARNm des récepteurs RAR $\alpha$  dans les PBMC de sujets âgés consommant plus de 30 verres d'alcool par semaine. D'autre part, nous avons aussi mis en évidence une suppression de l'hypoexpression des récepteurs des hormones thyroïdiennes TR $\alpha$ , dans les PBMC de sujets âgés consommateurs d'au moins 21 verres d'alcool par semaine (**figure 10**).

Ces résultats cliniques confortent nos résultats expérimentaux. Ils démontrent la sensibilité des voies d'action de l'AR et de la T3 aux conditions de consommation d'alcool. Par ailleurs, les récepteurs nucléaires, étudiés sur des cellules sanguines facilement prélevables, pourraient constituer des marqueurs originaux de l'impact de l'alcool sur les systèmes biologiques.



**Figure 10 : Schéma illustrant la «normalisation» de l'expression des ARNm des récepteurs TR $\alpha$ , dans les PBMC de sujets âgés consommateurs d'alcool**

\* : différence significative par rapport au groupe adulte

Le groupe adulte comprend 22 sujets âgés de 24 à 55 ans, recrutés dans nos laboratoires.

**CHAPITRE VI**  
**DISCUSSION GENERALE**





## **PARTIE EXPERIMENTALE**



## **Chapitre VI**

### **PARTIE EXPERIMENTALE**

#### **A. RAPPELS DES PRINCIPAUX RESULTATS**

Des données précédemment acquises au laboratoire de Nutrition et Signalisation Cellulaire chez des souris C57Bl/6 adultes, soumises à une consommation chronique d'alcool, ont mis en évidence une augmentation de l'activité de la voie de signalisation de l'acide rétinoïque (récepteurs nucléaires et gènes cibles), dans le foie (Pallet et coll., 1993) et dans le cerveau (Alfos et coll., 1996). Par ailleurs, des études comportementales effectuées dans le laboratoire de Neurosciences Cognitives chez des souris BALB/c soumises au même protocole d'alcoolisation ont montré l'apparition, chez ces animaux, de troubles mnésiques (Béracochéa et coll., 1987).

Dans ce contexte, le premier objectif de ce travail de thèse était de préciser la part prise par la surexpression des récepteurs de l'acide rétinoïque dans la genèse de certains troubles neurobiologiques observés dans nos conditions d'alcoolisation (éthanol 12% (v/v) pendant 10 mois). Nos résultats ont montré que l'administration d'un antagoniste spécifique des RAR $\beta$  chez les animaux alcoolisés (souris mâles C57Bl/6) supprime la surexpression des récepteurs de l'AR (RAR $\beta$ , RXR $\beta/\gamma$ ), et entraîne un effet facilitateur sur les capacités mnésiques. Ces résultats suggèrent que la surexpression des RARs dans le cerveau, induite par cette alcoolisation chronique, contribue à l'apparition de troubles cognitifs.

Ces résultats, ainsi que des données bibliographiques, montrent que l'alcool en interférant dans la biosynthèse de l'acide rétinoïque modifie l'expression de ses récepteurs nucléaires. D'autre part, ces résultats contribuent à conforter l'hypothèse qui suggère qu'une activité optimale de la voie de signalisation nucléaire des rétinoïdes soit requise pour un fonctionnement optimal des processus neurobiologiques et cognitifs.

Par ailleurs, d'autres études réalisées au laboratoire ont mis en évidence que le vieillissement entraînait une hypoexpression des voies de signalisation de l'AR et de la T3 dans le cerveau et l'apparition de troubles mnésiques spécifiques. De plus, la réactivation de ces voies de signalisation par l'administration d'AR aux animaux âgés supprime sélectivement et totalement les troubles spécifiques affectant leur mémoire relationnelle (Etchamendy et coll., 2001).

Dans ce contexte, le deuxième objectif de la thèse a consisté à éprouver l'hypothèse d'une «réinduction» de ces voies de signalisation par la consommation d'alcool, chez l'animal âgé, et d'étudier les conséquences potentielles de ce phénomène sur l'amélioration de leurs déficits mnésiques.

Dans ce but, nous avons soumis des souris de la lignée C57Bl/6 adultes et âgées à deux conditions d'alcoolisations chroniques : une alcoolisation induite par la consommation d'une solution d'éthanol à 12% (v/v) pendant 5 mois, et une alcoolisation plus modérée induite par la consommation d'une solution d'éthanol à 6% (v/v) pendant 5 mois. Dans les premières conditions d'alcoolisation (12%), des effets «bi-directionnels» apparaissent et sont fonction de l'âge. En effet, nos résultats montrent une surexpression des voies de signalisation de l'AR et de la T3 ainsi que l'apparition de troubles cognitifs chez l'animal adulte. En revanche, chez l'animal âgé, la consommation d'alcool s'accompagne de la suppression de l'hypoactivité de ces mêmes voies de signalisation et d'une facilitation des performances cognitives. Ces résultats nous ont conduits à étudier les effets d'une consommation plus modérée d'alcool (éthanol 6%). Dans ces conditions, les souris adultes ne présentent plus d'augmentation de l'activité des voies d'action des rétinoïdes et des hormones thyroïdiennes, ni d'altération de leurs performances cognitives. En revanche, les souris âgées alcoolisées dans ces mêmes conditions présentent une activité des voies d'action de l'AR et de la T3 supérieure à celle des animaux âgés témoins et une atténuation des troubles mnésiques liés au vieillissement.

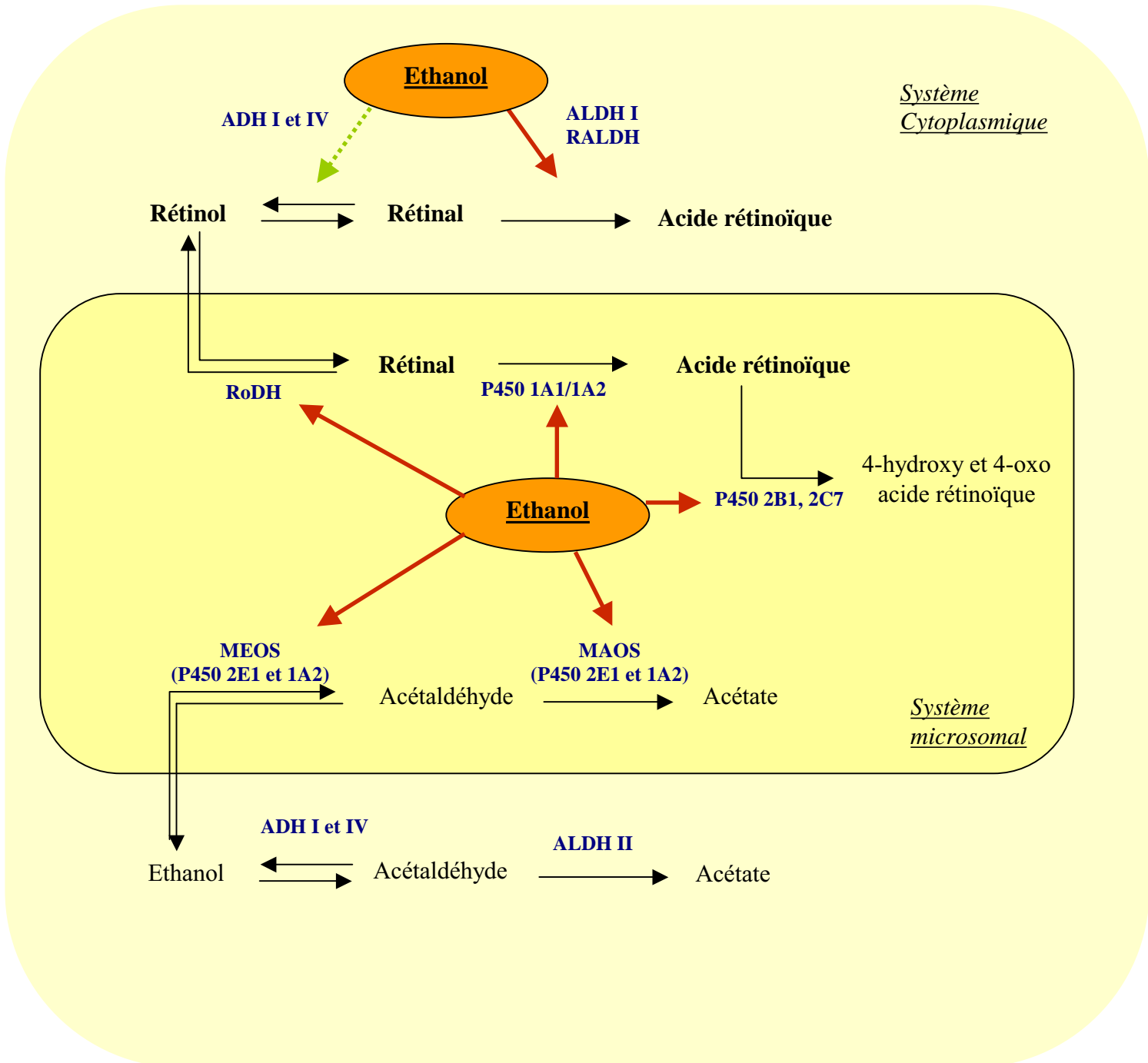
## **B. DISCUSSION GENERALE**

### **I- Implication potentielle de la suractivation des voies de signalisation de l'AR et de la T3 dans certains troubles neurobiologiques liés à une consommation chronique d'alcool chez l'animal adulte**

Les résultats de la partie expérimentale de ce travail montrent qu'une consommation chronique d'éthanol 12% (fournissant environ 20% de l'apport calorique total) s'accompagne d'une augmentation de l'activité de la voie de signalisation des rétinoïdes, se traduisant par une augmentation du taux des ARNm des récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque (RAR $\beta$  et RXR $\beta/\gamma$ ). Comme nous l'avons présenté dans l'introduction bibliographique (Chapitre I), plusieurs données de la littérature plaident en faveur d'une autorégulation des récepteurs de l'acide rétinoïque, et notamment du RAR $\beta$ , par leur ligand (Kato et coll., 1992 ; Yamagata et coll., 1993). De plus, des études *in vivo* ont mis en évidence la régulation positive des RAR $\beta$  et RXR $\beta/\gamma$  par l'acide rétinoïque, dans le cerveau (Husson et coll., 2003 ; Husson et coll., 2004). Des mécanismes d'autorégulation de la voie d'action de la vitamine A peuvent également affecter la mobilisation du rétinol et de l'acide rétinoïque (revue dans McCaffery et Dräger, 2000) ainsi que le métabolisme de la vitamine A (Pinaire et coll., 2003).

Par ailleurs les données de la littérature rapportent l'existence d'interférences entre le métabolisme de l'éthanol et celui de l'AR qui peuvent se traduire par l'augmentation de la synthèse de l'acide rétinoïque (**figure 11**) (revue dans Crabb et coll., 2001). Il est donc envisageable que la surexpression des récepteurs nucléaires des rétinoïdes, dans le cerveau des animaux alcoolisés, puisse en partie résulter d'une augmentation de la biodisponibilité intracellulaire de l'AR.

Des études comportementales réalisées dans le laboratoire de Neurosciences Cognitives ont mis en évidence l'apparition de troubles mnésiques spécifiques chez des souris adultes alcoolisées (Béracocchéa et coll., 1987 ; Krazem et coll., 2003a). Comme nous



**Figure 11 : Interférences entre les voies de métabolisation de la vitamine A et de l'éthanol**

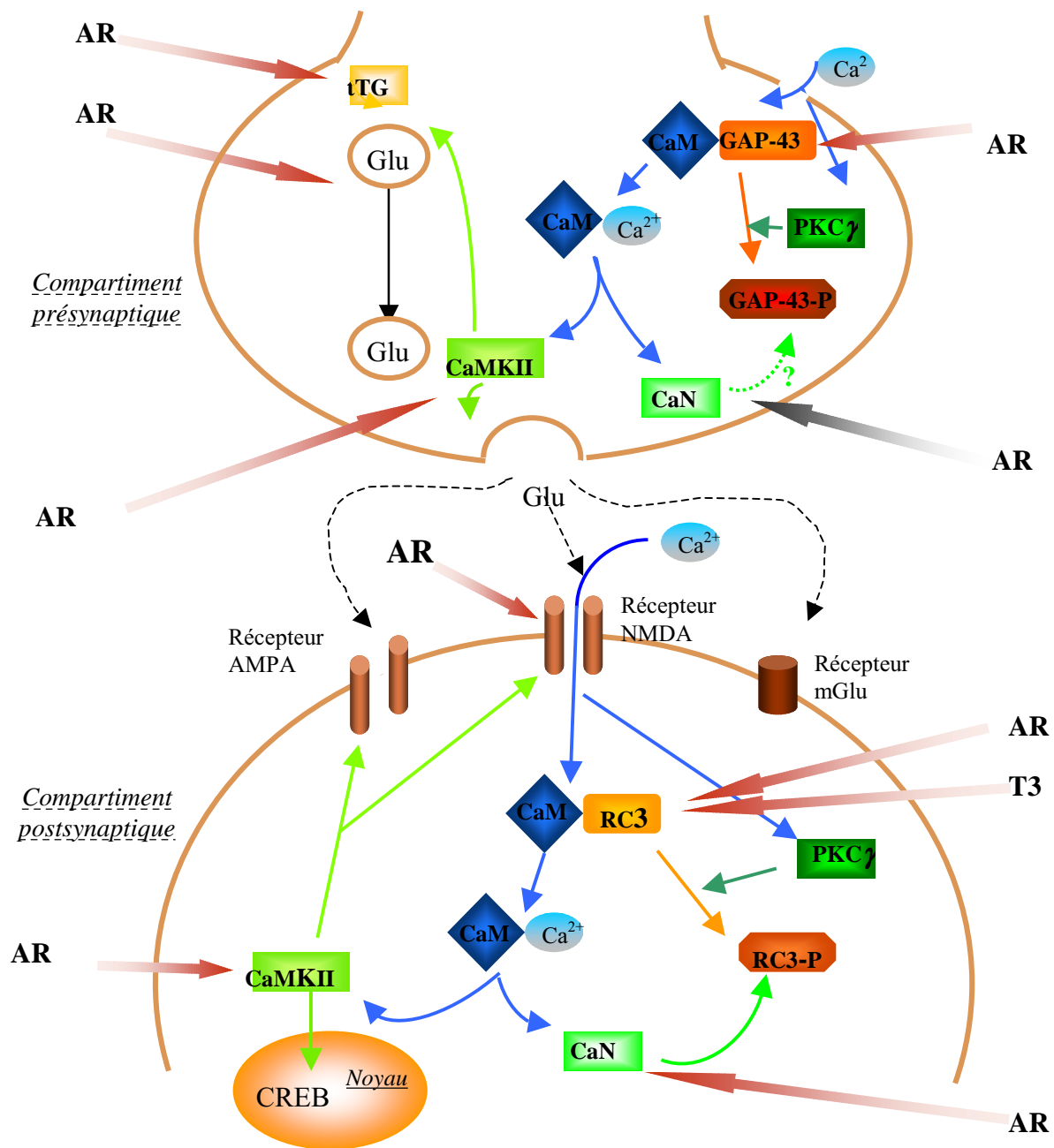
ADH1 et IV : alcool déshydrogénases de classe I et IV ; ALDH I et II : aldéhyde déshydrogénase de classe I et II ; RALDH : rétinol déshydrogénase ; MEOS : système microsomal d'oxydation de l'éthanol ; MAOS : système microsomal d'oxydation de l'acétaldéhyde ; P450 : cytochromes P450

Red arrow: Induction par l'éthanol      Dotted green arrow: Inhibition par l'éthanol

l'avons présenté dans la revue bibliographique la vitamine A joue des rôles essentiels dans le cerveau adulte, au niveau des processus neurobiologiques et mnésiques (Chiang et coll., 1998 ; Malik et coll., 2000 ; Cocco et coll., 2002), principalement via la régulation de gènes cibles. Parmi ces gènes, nous nous sommes particulièrement intéressés à la transglutaminase tissulaire (tTG), la neurogranine (RC3) et la neuromoduline (GAP-43), qui sont des protéines considérées comme de bons marqueurs de la plasticité synaptique (Friedrich et coll., 1991 ; Pak et coll., 2000 ; Routtenberg et coll., 2000). De plus, des relations fonctionnelles existent avec d'autres protéines codées par des gènes cibles des rétinoïdes et des hormones thyroïdiennes, comme celui de la protéine kinase CaM/Ca<sup>2+</sup> dépendante de thype II (CaMKII) (Chen et Kelly, 1996), le récepteur NMDA (Beczowska et coll., 1996), la calcineurine (Spannaus-Martin et Martin, 2000). Quelques niveaux d'intervention des rétinoïdes dans les synapses sont résumés dans la **figure 12**.

Dans ce contexte, nous avons voulu préciser la part prise par la surexpression des récepteurs de l'acide rétinoïque et la dérégulation consécutive de leurs gènes cibles, précédemment cités, dans la genèse de certains troubles neurobiologiques et mnésiques observés chez des animaux alcoolisés. Nos résultats montrent que l'administration d'un antagoniste spécifique du récepteur nucléaire RAR $\beta$  supprime, chez les animaux alcoolisés, l'augmentation de l'activité de la voie de signalisation de l'acide rétinoïque et supprime un déficit de mémoire spatiale (alternance spontanée). Ces résultats plaident en faveur d'une contribution de l'augmentation de l'expression des récepteurs nucléaires de l'AR dans l'apparition des troubles cognitifs, chez l'animal soumis à une alcoolisation chronique.

Nos résultats montrent aussi la surexpression des récepteurs nucléaires de la triiodothyronine (TR $\alpha/\beta$ ) dans le cerveau de souris adultes soumises à une alcoolisation chronique. Il est envisageable que la surexpression des TR $\alpha/\beta$  dans le cerveau des animaux alcoolisés traduise l'augmentation de la biodisponibilité de la T3 dans cet organe, puisque les TR sont régulés positivement par leur ligand (Lebel et coll., 1993 ; Husson et coll., 2003). Cette hypothèse est confortée par des données bibliographiques mettant en évidence l'existence d'interférences entre le métabolisme de l'éthanol et celui des hormones thyroïdiennes (Baumgartner et coll., 1997 ; Eravci et coll., 2000). Par ailleurs, le rôle des hormones thyroïdiennes dans le fonctionnement du cerveau est aujourd'hui bien documenté (revue dans Smith et coll., 2002), et les situations d'hyper- et d'hypothyroïdies sont associées à l'apparition de troubles cognitifs (Tremont et coll., 2003). Dans ce contexte, nos résultats



**Figure 12 : Schéma récapitulatif des différents niveaux d'intervention de rétinoides et des hormones thyroïdiennes au niveau d'une synapse.**

Glu : glutamate ; CaM : calmoduline ; CamKII : calmoduline kinase II ; PKC : protéine kinase C ; CaN : calcineurine ; tTG : transglutaminase tissulaire ; RC3 : neurogranine ; GAP-43 : neuromodiline ; AR : acide rétinolique ; T3 : triiodothyronine

○ Vésicule synaptique      → Régulation positive      → Régulation négative



suggèrent, que la surexpression des récepteurs nucléaires de la T3 peut aussi contribuer à la genèse de troubles mnésiques liés à une consommation chronique d'alcool.

Il est bien admis que des interférences existent entre les voies de signalisation des rétinoïdes et des hormones thyroïdiennes. En effet, en plus de l'existence du partenaire commun RXR nécessaire à l'hétérodimérisation de leurs récepteurs nucléaires, ces interactions peuvent aussi concerner différentes étapes du transport et du métabolisme de ces molécules. A titre d'exemple, le gène de la TSH peut être réprimé *in vivo* par l'acide 9-cis rétinoïque (Macchia et coll., 2002), et le statut en vitamine A influence le métabolisme de la thyroglobuline (Simon et coll., 2002). D'autre part, des hétérorégulations modifiant l'expression des récepteurs nucléaires des rétinoïdes et des hormones thyroïdiennes ont été mises en évidence, au laboratoire, chez des rats carencés en vitamine A, suite à l'administration d'AR ou de T3 (Husson et coll., 2003 ; Husson et coll., 2004). L'hétérorégulation entre ces deux voies de signalisation a été aussi montrée au niveau des récepteurs TR $\alpha$ 1, (Satyanarayana et coll., 1994) et TR $\beta$ 2 (Jones et coll., 1993), qui sont régulés positivement par l'AR. Les hormones thyroïdiennes, quant à elles, semblent contrôler les taux de RXR $\beta$  et RXR $\gamma$  (Mano et coll., 1993). De plus, des relations existent entre ces voies d'action des rétinoïdes et des hormones thyroïdiennes au niveau du contrôle de l'expression de gènes cibles communs, parmi lesquels figure celui de RC3 (Iñiguez et coll., 1994 ; Guadaño-Ferraz et coll., 1997) (**figure 12**).

En résumé, l'ensemble de ces données suggère l'implication d'une suractivation de la voie de signalisation de la vitamine A mais également de celle des hormones thyroïdiennes dans la genèse des troubles mnésiques observés chez des souris adultes soumises à une consommation chronique d'alcool.

## **II- La consommation chronique d'alcool maintien l'activité cellulaire des voies d'action de l'AR et de la T3 et atténue les troubles neurobiologiques chez le sujet âgé**

Compte tenu des résultats précédents, le deuxième objectif de ce travail visait à éprouver l'hypothèse selon laquelle une consommation modérée d'alcool, chez l'animal âgé, serait susceptible de réactiver les voies de signalisation des rétinoides et des hormones thyroïdiennes et, par voie de conséquence, d'améliorer certains déficits mnésiques liés au vieillissement.

Nos résultats montrent que les souris âgées soumises à une consommation chronique d'alcool (éthanol 12%) ne présentent plus l'hypoexpression, liée au vieillissement, des récepteurs TR $\alpha$ / $\beta$  et RAR $\beta$  (Enderlin et coll., 1997a). Les souris âgées soumises à une consommation plus modérée (éthanol 6%) présentent une atténuation de l'hypoexpression de ces mêmes récepteurs nucléaires.

Les différentes études sur le vieillissement suggèrent une diminution de la biodisponibilité intracellulaire de l'AR et de la T3. La capacité d'un organisme âgé à transporter et à métaboliser la vitamine A semble être altérée (Azaïs-Braesco et coll., 1995). De même, le vieillissement affecte les voies d'action des hormones thyroïdiennes (revue dans Smith et coll., 2002), provoquant dans un premier temps une diminution du taux de dégradation des hormones thyroïdiennes, puis la mise en jeu de «feed-back» négatifs induisant une diminution du taux de sécrétion de ces hormones. Dans nos conditions expérimentales, il peut être envisagé que la consommation d'alcool stimule l'activation métabolique de la vitamine A et des hormones thyroïdiennes et provoque ainsi une augmentation de l'activité de leurs voies de signalisation. C'est ainsi que la consommation d'alcool induirait, chez l'animal âgé, une atténuation, voire une suppression, de l'hypoexpression des gènes cibles de l'AR et de la T3 (GAP-43 et RC3), dans le cerveau entier mais aussi dans des structures cérébrales telles que l'hippocampe et le striatum.

De plus, dans nos conditions d'alcoolisations chroniques, les souris âgées présentent une amélioration de la mémoire déclarative/relationnelle, normalement altérée au cours du vieillissement (Krazem et coll., 2003a). Confrontés aux données biochimiques, ces résultats

confortent l'hypothèse selon laquelle l'amélioration des performances mnésiques des animaux âgés résulterait de l'activation des voies de signalisation de l'AR et de la T3. En effet, ces résultats sont à rapprocher de ceux obtenus sur le même test de mémoire déclarative/relationnelle chez l'animal âgé (Etchamendy et coll., 2001). Plus précisément, ces résultats obtenus en collaboration avec le laboratoire de Neurosciences Cognitives, ont montré que, (i) les souris âgées présentent une hypoactivité de la voie d'action des rétinoïdes concomitante à l'apparition de troubles mnésiques, (ii) l'administration d'acide rétinoïque à ces animaux réactive les voies de signalisation de l'AR et supprime totalement et sélectivement les déficits mnésiques de l'animal âgé.

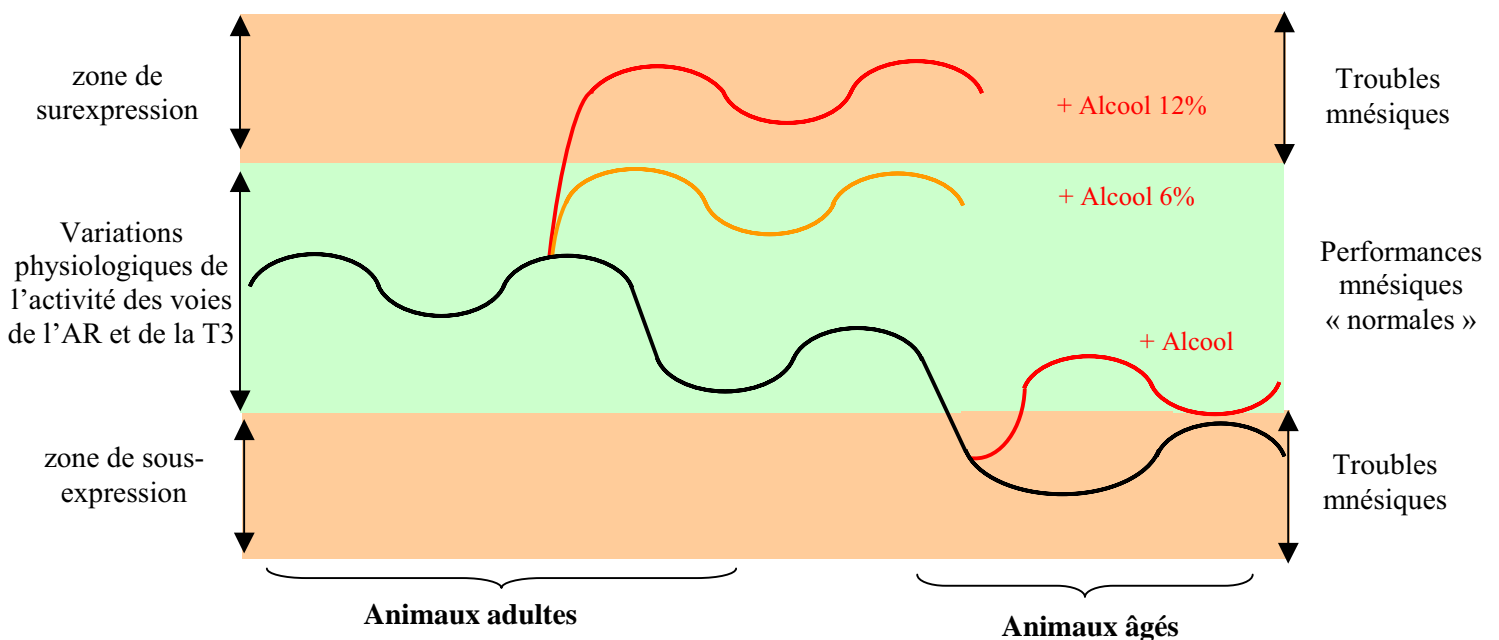
En résumé, l'ensemble des résultats expérimentaux présentés ci-dessus montre qu'une consommation chronique d'alcool est susceptible chez l'animal âgé, d'activer les voies de signalisation de l'acide rétinoïque et de la triiodothyronine et par voie de conséquence d'atténuer certains déficits mnésiques liés au vieillissement.

### **III- Les effets de l'alcool sur les voies de signalisation de l'AR et de la T3 dépendent non seulement des quantités d'alcool ingérées, mais aussi de l'âge des animaux**

Nos résultats montrent qu'une consommation chronique d'éthanol (12%) produit des effets «bi-directionnels» sur l'expression des voies de signalisation des rétinoïdes et des hormones thyroïdiennes et sur les capacités mnésiques selon l'âge des animaux. Plus précisément, des conditions d'alcoolisation identiques entraînent une suractivation des voies de signalisation de l'AR et de la T3 et l'apparition concomitante de troubles mnésiques, chez l'animal adulte, et au contraire, s'accompagnent, chez l'animal âgé, de l'activation de ces voies d'action et d'une amélioration des capacités mnésiques. Par la suite, nous avons cherché à savoir si une consommation plus faible d'alcool se rapprochant des doses considérées comme modérées par les experts en santé publique induisait également cet effet «bi-directionnel». Nos résultats montrent que cette alcoolisation modérée (éthanol 6%)

n'induit plus les troubles mnésiques chez les animaux adultes, tout en maintenant un effet facilitateur sur les performances cognitives des animaux âgés.

Dans une perspective plus générale, ces résultats apportent de nouveaux arguments en faveur de la nécessité d'un niveau optimum de l'activité des voies de signalisation des rétinoides et des hormones thyroïdiennes nécessaire au maintien des performances cognitives. La **figure 13** représente un schéma synthétique illustrant les effets «bi-directionnels» de la consommation d'alcool sur les performances mnésiques en fonction de l'âge.



**Figure 13 : Schéma synthétique illustrant les conséquences de la consommation d'alcool sur l'activité des voies de signalisation de l'AR et de la T3 et les capacités mnésiques en fonction de l'âge**

**PARTIE BIOMEDICALE**

## **PARTIE BIOMEDICALE**

### **A. RAPPELS DES PRINCIPAUX RESULTATS**

Comme nous venons de le voir, l'approche expérimentale de ce travail de thèse a mis en évidence une réinduction, consécutive à une consommation modérée d'alcool, des voies d'action nucléaires des rétinoïdes et des hormones thyroïdiennes chez l'animal âgé. Nous avons ensuite cherché à éprouver chez l'Homme nos hypothèses construites à partir de ces données expérimentales. Pour cela, nous avons quantifié l'expression des récepteurs nucléaires de l'AR et de la T3 dans les cellules mononucléées du sang de sujets âgés, consommateurs ou non d'alcool.

Dans cette étude biomédicale, nous avons mesuré, chez des sujets consommateurs d'alcool ou non, d'une part, plusieurs paramètres sériques caractéristiques des statuts vitaminique A et thyroïdien et d'autre part l'expression des récepteurs nucléaires de l'AR et de la T3, dans les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC). Nos résultats ne mettent pas en évidence de modifications significatives des statuts vitaminique A et thyroïdien chez les sujets âgés consommateurs d'alcool. De plus, nous n'avons observé aucune corrélation significative entre la consommation d'alcool et l'expression des récepteurs  $RAR\gamma$ ,  $RXR\alpha$  et  $TR\beta$ . Par contre, nous avons mis en évidence des corrélations significatives, non linéaires, entre la consommation d'alcool et l'expression des récepteurs  $RAR\alpha$  et  $TR\alpha$ , dans les PBMC des sujets âgés.



## **B. DISCUSSION GENERALE**

### **I- Dans la population étudiée, la consommation d'alcool ne modifie pas les statuts vitaminique A et thyroïdien des sujets âgés**

Chez les sujets âgés consommateurs d'alcool une tendance à l'augmentation de la concentration sérique du rétinol est décelable seulement chez les buveurs excessifs (> 21 verres d'alcool/semaine) par rapport aux consommateurs modérés et aux non-buveurs. Les données bibliographiques disponibles sur ce sujet restent contradictoires et suggèrent que les effets de l'alcool sur la concentration sérique de rétinol dépendent de la quantité d'alcool ingérée mais aussi de la présence, ou non, de pathologies hépatiques associées au syndrome alcoolique (Walmsley et coll., 1998 ; Fernandez-Sola et coll., 1998 ; Bergheim et coll., 2003).

En ce qui concerne le statut thyroïdien, les valeurs des concentrations sériques de T3, T4, TSH et TTR ne sont pas corrélées avec la quantité d'alcool consommée par les sujets. Néanmoins, nous avons observé une augmentation significative de la concentration sérique de TTR et de T4 chez les buveurs excessifs. Les données bibliographiques disponibles sur ces aspects et décrivant les effets de l'alcool sur le statut sérique thyroïdien ont souvent été obtenues sur des populations de patients alcooliques après leur sevrage. C'est pourquoi ces résultats sont difficilement comparables aux nôtres d'autant plus qu'ils sont souvent contradictoires, obtenus après des temps de sevrage variables, chez des sujets présentant différents états pathologiques.

Ainsi dans la population étudiée, la consommation d'éthanol ne modifie apparemment ni le statut vitaminique A ni le statut thyroïdien. Ces résultats doivent cependant être interprétés avec prudence. En effet, des données récentes soulignent le fait que les concentrations sériques de rétinol et d'hormones thyroïdiennes ne reflètent pas toujours fidèlement la biodisponibilité cellulaire de leurs métabolites actifs (AR et T3). A titre d'exemple, Berggren-Söderlund et coll., (2003) ont mesuré les concentrations sériques de rétinol et d'acide rétinoïque chez des sujets sains et obèses, et mis en évidence une absence de corrélation entre ces deux paramètres. De plus, dans une revue récente concernant le mode d'action des hormones thyroïdiennes il est souligné que la biodisponibilité intracellulaire des



ces hormones dépend de différents facteurs parmi lesquels figurent le transport transmembranaire et la présence de déiodinases dans les cellules cibles. Il en résulte que les concentrations sériques de T3 et T4, qui apparaissent bien régulées, ne sont pas toujours prédictives de la biodisponibilité intracellulaire de la triiodothyronine (Bassett et coll., 2003).

En revanche, les mesures effectuées directement sur les PBMC semblent plus pertinentes pour évaluer chez l'Homme, des variations dans les tissus cibles des statuts vitaminique A et thyroïdien (Meier-Heusler et coll., 1995 ; Ballow et coll., 2003). C'est pourquoi nous avons mesuré l'expression des récepteurs nucléaires de l'AR et de la T3, dans les PBMC de sujets consommateurs ou non d'alcool.

## **II- L'expression des récepteurs $RAR\alpha$ et $TR\alpha$ dans les PBMC de sujets âgés est corrélée à la quantité d'alcool consommé**

Nos résultats ont mis en évidence des corrélations significatives, non linéaires, entre le niveau de consommation d'alcool et l'expression des ARNm des récepteurs nucléaires  $RAR\alpha$  et  $TR\alpha$ , dans les PBMC de sujets âgés. Les représentations graphiques de ces corrélations (**figure 9**) montrent une légère diminution de l'expression des ARNm de ces récepteurs dans les PBMC de buveurs modérés par rapport à des sujets non-buveurs. Par contre, les buveurs excessifs d'alcool ( $\geq 30$  verres/semaine) présentent une augmentation significative du niveau d'expression de ces mêmes ARNm. Ces résultats sont à rapprocher de ceux de nos études expérimentales montrant un «effet dose» de l'alcool sur l'expression des récepteurs nucléaires de l'AR et de la T3.

Les interférences entre les métabolismes de l'alcool et ceux de l'AR et de la T3 (revue dans Leo et Lieber, 1999 ; Baumgartner et coll., 1997) sont probablement à l'origine des modifications de la biodisponibilité de l'AR et de la T3 dans les PBMC de sujets âgés consommateurs d'alcool. Il est notamment envisageable que les effets différents sur la synthèse d'AR engendrés par des consommations occasionnelles (inhibition des ADH et de la synthèse d'AR) ou chroniques (induction d'enzymes microsomales et augmentation de la synthèse d'AR) expliquent la forme de la courbe qui traduit la relation entre la consommation d'alcool et l'expression des ARNm des récepteurs  $RAR\alpha$  et  $TR\alpha$  dans les PBMC.

Les conséquences d'une augmentation intracellulaire d'AR sur l'expression de ses récepteurs nucléaires diffèrent selon les tissus. Dans le cerveau l'AR induit l'expression du récepteur  $RAR\beta$ , sans affecter celle de  $RAR\alpha$  (Yamagata et coll., 1993), alors que dans les PBMC seul le taux des ARNm du récepteur  $RAR\alpha$  semble être affecté. Cette variabilité tissulaire provient de la distribution différentielle de chaque isoforme de récepteur, dont les régulations par l'AR sont différentes. En ce qui concerne les récepteurs des hormones thyroïdiennes, les résultats de nos études expérimentales et biomédicales sont cohérents. En effet, ces deux approches nous ont permis de mettre en évidence une augmentation, induite par l'alcool, du taux d'ARNm des récepteurs  $TR\alpha/\beta$  (dans le cerveau de souris) et  $TR\alpha$  (dans les PBMC de personnes âgées). Chez l'animal âgé alcoolisé nous avons mesuré une augmentation globale des TR sans différencier les isoformes  $\alpha$  et  $\beta$ . Néanmoins, la forme majoritairement exprimée dans le cerveau semble correspondre à  $TR\alpha$  (Bradley et coll., 1989).

En résumé, cette étude biomédicale nous a permis de mettre en évidence que l'expression des récepteurs nucléaires dans les PBMC pouvait être, chez l'Homme, un bon marqueur des modifications de l'action de l'AR et de la T3, induites par une consommation chronique d'alcool. Compte tenu de l'action de type hormonal de l'AR et de la T3, il est probable que les variations d'expression de leurs récepteurs nucléaires se retrouvent dans les différents tissus cibles de l'organisme. C'est notamment le cas dans le sang et le tissu adipeux de sujets obèses qui présentent des modifications de l'expression des récepteurs nucléaires comparables (Redonnet et coll., 2002 ; Redonnet : communication personnelle). S'il en est de même dans le cerveau, il est envisageable à l'avenir de chercher à établir des relations entre les statuts vitaminique A et thyroïdien et les performances cognitives de sujets consommateurs d'alcool.



## **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**



## **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

Notre travail s'inscrit dans le courant de recherche qui vise à mieux comprendre le rôle des rétinoïdes et des hormones thyroïdiennes dans les processus neurobiologiques et cognitifs. Aujourd'hui, les recherches de l'Unité de Nutrition et Signalisation Cellulaire, menées en collaboration avec le Laboratoire de Neurosciences Cognitives, sont plus particulièrement consacrées à l'étude de ces voies de signalisation au cours du vieillissement cérébral. L'activité de ces voies de signalisation est dépendante des conditions nutritionnelles et notamment de la consommation d'alcool dont on sait qu'elle a des répercussions sur la biodisponibilité de l'AR et de la T3. C'est pourquoi, le travail de thèse présenté avait pour but de mieux comprendre les effets d'une consommation chronique d'alcool sur l'action cellulaire de l'AR et de la T3, chez l'animal et l'Homme.

Nos résultats confortent l'hypothèse de l'implication de la surexpression des voies de signalisation de l'AR et de la T3 dans l'apparition de troubles mnésiques spécifiques chez l'animal alcoolisé. Par ailleurs, nous avons montré qu'une consommation modérée d'alcool est susceptible, chez l'animal âgé, d'activer les voies de signalisation de la vitamine A et des hormones thyroïdiennes et d'atténuer les troubles cognitifs associés au vieillissement. Ces résultats étayent les données qui suggèrent qu'un niveau optimal des rétinoïdes et des hormones thyroïdiennes est nécessaire au maintien de capacités cognitives normales.

Ce travail apporte de nouvelles données sur les répercussions d'une consommation d'alcool sur l'action cellulaire de l'AR et de la T3, et souligne la nécessité de prendre en compte non seulement les quantités d'alcool ingérées mais aussi l'âge des sujets.

Par ailleurs, les résultats acquis dans des conditions d'alcoolisations modérées (modèle à 6%) ou lors d'une alcoolisation chronique de 6 à 10 mois (Pallet et coll., 1993 ;

Alfos et coll., 1996) suggèrent que la voie de signalisation de la T3 est particulièrement sensible à la prise d'alcool.

Dans une étude biomédicale, nous avons cherché à éprouver nos hypothèses chez l'Homme. Nos résultats montrent que l'expression des récepteurs nucléaires dans les cellules mononucléées du sang peut être reliée à la quantité d'alcool ingérée par les sujets. Il est donc envisageable que l'expression des récepteurs nucléaires puisse devenir l'un des marqueurs de l'impact de l'alcool sur l'expression des gènes dans les systèmes biologiques. Des études complémentaires sont nécessaires pour valider cette approche.

Des données récentes de la littérature soulignent les relations potentielles entre des dérégulations des voies d'action des rétinoïdes et des hormones thyroïdiennes et l'apparition de diverses pathologies cérébrales (Goodman et Pardee, 2003 ; Tremont et coll., 2003). Dans ce contexte, une des perspectives de cette thèse consistera à étudier, chez l'Homme, les relations entre la consommation d'alcool, l'expression des récepteurs nucléaires de l'AR et de la T3 dans les PBMC, et les performances cognitives.

Par ailleurs, ce travail de thèse peut servir de base à un autre axe de recherche. Il consistera à étudier l'action cellulaire des rétinoïdes et des hormones thyroïdiennes chez des sujets atteints de pathologies alcooliques.

Dans un contexte plus général, ce travail s'inscrit dans les recherches en Nutrition Humaine qui ont pour but de mieux comprendre les relations entre l'alimentation et la santé. L'approche dans ce domaine a considérablement évolué au cours des dernières années. Pendant longtemps les recherches étaient essentiellement consacrées à l'étude des effets négatifs, déclenchants ou aggravants, que peuvent générer certains déséquilibres alimentaires ou certains constituants du régime. Aujourd'hui un changement profond apparaît dans la façon d'aborder les relations entre l'alimentation et la santé. Une plus grande place est accordée à la recherche des effets d'une consommation raisonnable en certains nutriments dans le maintien, sinon l'amélioration, d'un bon état de santé. Nos orientations de recherche s'inscrivent dans cette nouvelle perspective bien que les retombées de nos travaux puissent aussi concerner des aspects liés à la sécurité nutritionnelle (population cible non atteinte, consommation trop élevée, ...).

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**





**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- Agarwal DP. Genetic polymorphisms of alcohol metabolizing enzymes. *Pathol Biol (Paris)*, **49**, 703-709, 2001.
- Alfos S, Higuieret P, Pallet V, Higuieret D, Garcin H, Jaffard R. Chronic ethanol consumption increases the amount of mRNA for retinoic acid and triiodothyronine receptors in mouse brain. *Neurosci Lett*, **206**, 73-76, 1996.
- Alfos S, Boucheron C, Pallet V, Higuieret D, Enderlin V, Béracochéa D, Jaffard R, Higuieret P. A retinoic acid receptor antagonist suppresses brain retinoic receptor overexpression and reverses a working memory deficit induced by chronic ethanol consumption in mice. *Alcohol Clin Exp Res*, **25**, 1506-1514, 2001.
- Allali-Hassani A, Peralba JM, Martras S, Farres J, Pares X. Retinoids, omega-hydroxyfatty acids and cytotoxic aldehydes as physiological substrates, and H2-receptor antagonists as pharmacological inhibitors, of human class IV alcohol dehydrogenase. *FEBS Lett*, **426**, 362-366, 1998.
- Allgaier C. Ethanol sensitivity of NMDA receptors. *Neurochem Int*, **41**, 377-382, 2002.
- Almeida MR, Alves IL, Terazaki H, Ando Y, Saraiva MJ. Comparative studies of two transthyretin variants with protective effects on familial amyloidotic polyneuropathy: TTR R104H and TTR T119M. *Biochem Biophys Res Commun*, **270**, 1024-1028, 2000.
- Alvarez-Dolado M, Iglesias T, Rodriguez-Pena A, Bernal J, Munoz A. Expression of neurotrophins and the trk family of neurotrophin receptors in normal and hypothyroid rat brain. *Brain Res Mol Brain Res*, **27**, 249-257, 1994.
- Anderson KD, Sengupta J, Morin M, Neve RL, Valenzuela CF, Perrone-Bizzozero NI. 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**, 250-258, 2001.
- Anderton BH. Ageing of the brain. *Mech Ageing Dev*, **123**, 811-817, 2002.
- Aranda A, Pascual A. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev*, **81**, 1269-1304, 2001.
- Ashizawa K, Fukuda T, Cheng SY. Transcriptional stimulation by thyroid hormone of a cytosolic thyroid hormone binding protein which is homologous to a subunit of pyruvate kinase M1. *Biochemistry*, **31**, 2774-2778, 1992.
- Ashton AC, Dolly JO. Microtubules and microfilaments participate in the inhibition of synaptosomal noradrenaline release by tetanus toxin. *J Neurochem*, **68**, 649-658, 1997.
- Auber DFE. *Bloomsbury biographic dictionary of quotations*, (éd. Bloomsbury. London (UK)), 1997.
- Azais-Braesco V, Moriniere C, Guesne B, Partier A, Bellenand P, Baguelin D, Grolier P, Alix E. 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**, 151-161, 1995.
- Ballow M, Wang X, Xiang S, Allen C. Expression and regulation of nuclear retinoic acid receptors in human lymphoid cells. *J Clin Immunol*, **23**, 46-54, 2003.
- Bassett JHD, Harvey CB, Williams GR. Mechanisms of thyroid hormone receptor-specific nuclear and extra nuclear actions. *Mol Cell Endocrinol*, **213**, 1-11, 2003.
- Bastien J, Rochette-Egly C. Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. *Gene*, **328**, 1-16, 2004.
- Baumgartner A, Heyne A, Campos-Barros A, Kohler R, Muller F, Meinhold H, Rommelspacher H, Wolffgramm J. Hypothalamic-pituitary-thyroid axis in chronic alcoholism. II. Deiodinase activities and thyroid hormone concentrations in brain and peripheral tissues of rats chronically exposed to ethanol. *Alcohol Clin Exp Res*, **18**, 295-304, 1994.
- Baumgartner A, Eravci M, Pinna G, Hiedra L, Prengel H, Brodel O, Meinhold H. Thyroid hormone metabolism in the rat brain in an animal model of 'behavioral dependence' on ethanol. *Neurosci Lett*, **227**, 25-28, 1997.
- Baumgartner A, Pinna G, Hiedra L, Bauer F, Wolf J, Eravci M, Prengel H, Brodel O, Schmidt G, Meinhold H. Effects of acute administration of ethanol and the mu-opiate agonist etonitazene on thyroid hormone metabolism in rat brain. *Psychopharmacology (Berl)*, **135**, 63-69, 1998.
- Beckman M, Iverfeldt K. Increased gene expression of beta-amyloid precursor protein and its homologues APLP1 and APLP2 in human neuroblastoma cells in response to retinoic acid. *Neurosci Lett*, **221**, 73-76, 1997.
- Beczowska IW, Buck J, Inturrisi CE. Retinoic acid-induced increase in delta-opioid receptor and N-methyl-D-aspartate receptor mRNA levels in neuroblastoma x glioma (NG108-15) cells. *Brain Res Bull*, **39**, 193-199 1996.
- Bedo G, Santisteban P, Aranda A. Retinoic acid regulates growth hormone gene expression. *Nature*, **339**, 231-234, 1989.
- Benowitz LI, Routtenberg A. GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity. *Trends Neurosci*, **20**, 84-91, 1997.
- Beracochea D, Lescaudron L, Tako A, Verna A, Jaffard R. Build-up and release from proactive interference during chronic ethanol consumption in mice: a behavioral and neuroanatomical study. *Behav Brain Res*, **25**, 63-74, 1987.
- Berggren-Söderlund M, Fex G, Nilsson-Ehle P. Decreasing serum concentrations of all-trans, 13-cis retinoic acids and retinol during fasting and caloric restriction. *J Intern Med*, **253**, 375-380, 2003.
- Bergheim I, Parlesak A, Dierks C, Bode JC, Bode C. Nutritional deficiencies in German middle-class male alcohol consumers: relation to dietary intake and severity of liver disease. *Eur J Clin Nutr*, **57**, 431-438, 2003.
- Bernal J, Nunez J. Thyroid hormones and brain development. *Eur J Endocrinol*, **133**, 390-398, 1995.
- Bernal J. Action of thyroid hormone in brain. *J Endocrinol Invest*, **25**, 268-288, 2002.
- Bernal J, Guadano-Ferraz A, Morte B. Perspectives in the study of thyroid hormone action on brain development and function. *Thyroid*, **13**, 1005-1012, 2003.

- Bernardini S, Melino G, Saura F, Annicchiarico-Petruzzelli M, Motti C, Cortese C, Federici G. Expression of co-factors (SMRT and Trip-1) for retinoic acid receptors in human neuroectodermal cell lines. *Biochem Biophys Res Commun*, **234**, 278-282, 1997.
- Berse B, Blusztajn JK. Coordinated up-regulation of choline acetyltransferase and vesicular acetylcholine transporter gene expression by the retinoic acid receptor alpha, cAMP, and leukemia inhibitory factor/ciliary neurotrophic factor signaling pathways in a murine septal cell line. *J Biol Chem*, **270**, 22101-22104, 1995.
- Bianco AC, Salvatore D, Gereben B, Berry MJ, Larsen PR. Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocr Rev*, **23**, 38-89, 2002.
- Bjorneboe GE, Johnsen J, Bjorneboe A, Rousseau B, Pedersen JI, Norum KR, Morland J, Drevon CA. Effect of alcohol consumption on serum concentration of 25-hydroxyvitamin D3, retinol, and retinol-binding protein. *Am J Clin Nutr*, **44**, 678-682, 1986.
- Blaner WS, Hendriks HF, Brouwer A, de Leeuw AM, Knook DL, Goodman DS. Retinoids, retinoid-binding proteins, and retinyl palmitate hydrolase distributions in different types of rat liver cells. *J Lipid Res*, **261**, 241-251, 1985.
- Blaner WS, Olson JA. Retinol and retinoic acid metabolism. *The retinoids. Biology, Chemistry and Medicine* (ed Sporn MB, Roberts AB, Goodman DS., 2<sup>th</sup> edition ; New York: Raven Press), 229-255, 1994.
- Blay P, Nilsson C, Owman C, Aldred A, Schreiber G. Transthyretin expression in the rat brain: effect of thyroid functional state and role in thyroxine transport. *Brain Res*, **632**, 114-120, 1993.
- Bliss TV, Collingridge GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, **361**, 31-39, 1993.
- Blomhoff R, Green MH, Green JB, Berg T, Norum KR. Vitamin A metabolism: new perspectives on absorption, transport, and storage. *Physiol Rev*, **71**, 951-990, 1991.
- Blomhoff R. Transport and metabolism of vitamin A. *Nutr Rev*, **52**, S13-S23, 1994.
- Boerman MH, Napoli JL. Cellular retinol-binding protein-supported retinoic acid synthesis. Relative roles of microsomes and cytosol. *J Biol Chem*, **271**, 5610-5616, 1996.
- Boileau AC, Lee CM, Erdman JW. Vitamin A deficiency reduces uptake of beta-carotene by brush border membrane vesicles but does not alter intestinal retinyl ester hydrolase activity in the rat. *Nutr Biocem*, **11**, 436-442, 2000.
- Boleda MD, Saubi N, Farres J, Pares X. Physiological substrates for rat alcohol dehydrogenase classes: aldehydes of lipid peroxidation, omega-hydroxyfatty acids, and retinoids. *Arch Biochem Biophys*, **307**, 85-90, 1993.
- Bradley DJ, Young WS 3rd, Weinberger C. Differential expression of alpha and beta thyroid hormone receptor genes in rat brain and pituitary. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 7250-4, 1989.
- Brandner C, Vantini G, Schenk F. Postnatal intracerebroventricular administrations of NGF alter spatial memory in adulthood. *Behav Brain Res*, **111**, 165-173, 2000.
- Burmeister LA, Pachucki J, St Germain DL. Thyroid hormones inhibit type 2 iodothyronine deiodinase in the rat cerebral cortex by both pre- and posttranslational mechanisms. *Endocrinology*, **138**, 5231-5237, 1997.

- Calzà L, Aloe L, Giardino L. Thyroid hormone-induced plasticity in the adult rat brain. *Brain Res Bull*, **44**, 549-557, 1997.
- Carmichael FJ, Orrego H, Saldivia V, Israel Y. Effect of propylthiouracil on the ethanol-induced increase in liver oxygen consumption in awake rats. *Hepatology*, **18**, 415-421, 1993.
- Casoli T, Di Stefano G, Gracciotti N, Fattoretti P, Solazzi M, Bertoni-Freddari C. Age-related effects of moderate alcohol consumption on GAP-43 levels in rat hippocampus. *Mech Ageing Dev*, **122**, 1723-1738, 2001.
- Castell X, Diebler MF, Tomasi M, Bigari C, De Gois S, Berrard S, Mallet J, Israel M, Dolezal V. More than one way to toy with ChAT and VAcHT. *J Physiol (Paris)*, **96**, 61-72, 2002.
- Cayrou C, Denver RJ, Puymirat J. Suppression of the basic transcription element-binding protein in brain neuronal cultures inhibits thyroid hormone-induced neurite branching. *Endocrinology*, **143**, 2242-2249, 2002.
- Chambaut-Guerin AM, Rouher C, Gauthereau X. p55 tumour necrosis factor receptors distribution in neuroblastoma cells. *Neuroreport*, **8**, 1451-1456, 1997.
- Chambon P. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J*, **10**, 940-954, 1996.
- Chandler LJ. Ethanol and brain plasticity: receptors and molecular networks of the postsynaptic density as targets of ethanol. *Pharmacol Ther*, **99**, 311-326, 2003.
- Chen H, Howald WN, Juchau MR. Biosynthesis of all-trans-retinoic acid from all-trans-retinol: catalysis of all-trans-retinol oxidation by human P-450 cytochromes. *Drug Metab Dispos*, **28**, 315-322 2000.
- Chen J, Kelly PT. Retinoic acid stimulates alpha-CAMKII gene expression in PC12 cells at a distinct transcription initiation site. *J Neurosci*, **16**, 5704-5714, 1996.
- Chen JD, Evans RM. A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature*, **377**, 454-457, 1995.
- Chen M, Achkar C, Gudas LJ. Enzymatic conversion of retinaldehyde to retinoic acid by cloned murine cytosolic and mitochondrial aldehyde dehydrogenases. *Mol Pharmacol*, **46**, 88-96, 1994.
- Chen SJ, Sweatt JD, Klann E. Enhanced phosphorylation of the postsynaptic protein kinase C substrate RC3/neurogranin during long-term potentiation. *Brain Res*, **749**, 181-7, 1997.
- Chen ZY, Chai YF, Cao L, Lu CL, He C. Glial cell line-derived neurotrophic factor enhances axonal regeneration following sciatic nerve transection in adult rats. *Brain Res*, **902**, 272-276, 2001.
- Cheng LY, Outterbridge LV, Covatta ND, Martens DA, Gordon JT, Dratman MB. Film autoradiography identifies unique features of [125I]3,3',5'-(reverse) triiodothyronine transport from blood to brain. *J Neurophysiol*, **72**, 380-391, 1994.
- Chiang MY, Mismar D, Kempermann G, Schikorski T, Giguere V, Sucov HM, Gage FH, Stevens CH, Evans RM. An essential role for retinoid receptors RAR $\beta$  and RXR $\gamma$  in long-term potentiation and depression. *Neuron*, **21**, 1353-1361, 1998.
- Chin WW, Yen PM. Molecular mechanisms of nuclear thyroid hormone action. *Contemporary Endocrinology: Disease of the Thyroid* (ed. Braverman L.E.; Humana Press Inc., Totowa, NJ), 1-15, 1997.

- Chiocca EA, Davies PJ, Stein JP. Regulation of tissue transglutaminase gene expression as a molecular model for retinoid effects on proliferation and differentiation. *J Cell Biochem*, **39**, 293-304, 1989.
- Cocco S, Diaz G, Stancampiano R, Diana A, Carta M, Curreli R, Sarais L, Fadda F. Vitamin A deficiency produces spatial learning and memory impairment in rats. *Neuroscience*, **115**, 475-482, 2002.
- Connor MJ, Sidell N. Retinoic acid synthesis in normal and Alzheimer diseased brain and human neural cells. *Mol Chem Neuropathol*, **30**, 239-252, 1997.
- Cook CB, Koenig RJ. Expression of erbA alpha and beta mRNAs in regions of adult rat brain. *Mol Cell Endocrinol*, **70**, 13-20, 1990.
- Cooper A. Hepatic uptake of chylomicron remnants. *J Lipid Res*, **38**, 2173-2192, 1997.
- Correa M, Sanchis-Segura C, Aragon CM. Brain catalase activity is highly correlated with ethanol-induced locomotor activity in mice. *Physiol Behav*, **73**, 641-647, 2001.
- Corrêa da Costa VM, Rosenthal D. Effect of aging on thyroidal and pituitary T4-5'-deiodinase activity in female rats. *Life Sci*, **59**, 1515-1520, 1996.
- Corrêa da Costa VM, Moreira DG, Rosenthal D. Thyroid function and aging: gender-related differences. *J Endocrinol*, **171**, 193-198, 2001.
- Crabb DW, Pinairs J, Hasanadka R, Fang M, Leo MA, Lieber CS, Tsukamoto H, Motomura K, Miyahara T, Ohata M, Bosron W, Sanghani S, Kedishvili N, Shiraiishi H, Yokoyama H, Miyagi M, Ishii H, Bergheim I, Menzl I, Parlesak A, Bode C. Alcohol and retinoids. *Alcohol Clin Exp Res*, **25**, 207S-217S, 2001.
- Cullingford TE, Bhakoo K, Peuchen S, Dolphin CT, Patel R, Clark JB. Distribution of mRNAs encoding the peroxisome proliferator-activated receptor alpha, beta, and gamma and the retinoid X receptor alpha, beta, and gamma in rat central nervous system. *J Neurochem*, **70**, 1366-1375, 1998.
- Danel T, Touitou Y. Alcohol decreases the nocturnal peak of TSH in healthy volunteers. *Psychopharmacology (Berl)*, **170**, 213-214, 2003.
- Deltour L, Ang HL, Duester G. Ethanol inhibition of retinoic acid synthesis as a potential mechanism for fetal alcohol syndrome. *FASEB J*, **10**, 1050-1057, 1996.
- De Luca LM. Retinoids and their receptors in differentiation, embryogenesis, and neoplasia. *FASEB J*, **5**, 2924-2933, 1991.
- De Thé H, Marchio A, Tiollais P, Dejean A. Differential expression and ligand regulation of the retinoic acid receptor alpha and beta genes. *EMBO J*, **8**, 429-433, 1989.
- Dev S, Adler AJ, Edwards RB. Adult rabbit brain synthesizes retinoic acid. *Brain Res*, **632**, 325-328, 1993.
- De Witte P, Pinto E, Anseau M, Verbanck P. Alcohol and withdrawal : from animal research to clinical issues. *Neurosci Biobehav Reviews*, **27**, 189-197, 2003.
- Dew SE, Ong DE. Specificity of the retinol transporter of the rat small intestine brush border. *Biochemistry*, **33**, 12340-12345, 1994.
- Dickson PW, Aldred AR, Menting JG, Marley PD, Sawyer WH, Schreiber G. Thyroxine transport in choroid plexus. *J Biol Chem*, **262**, 13907-13915, 1987.

- Divino CM, Schussler GC. Receptor-mediated uptake and internalization of transthyretin. *J Biol Chem*, **265**, 1425-1429, 1990.
- Dratman MB, Gordon JT. Thyroid hormones as neurotransmitters. *Thyroid*, **6**, 639-647, 1996.
- Duarte J, Perriere G, Laudet V, Robinson-Rechavi M. NUREBASE: database of nuclear hormone receptors. *Nucleic Acids Res*, **30**, 364-368, 2002.
- Duester G, Ang HL, Deltour L, Foglio MH, Hayamizu TF, Zgombic-Knight M. Class I and class IV alcohol dehydrogenase (retinol dehydrogenase) gene expression in mouse embryos. *Adv Exp Med Biol*, **372**, 301-313, 1995.
- Duester G. Involvement of alcohol dehydrogenase, short-chain dehydrogenase/reductase, aldehyde dehydrogenase, and cytochrome P450 in the control of retinoid signaling by activation of retinoic acid synthesis. *Biochemistry*, **35**, 12221-12227, 1996.
- Duester G. Alcohol dehydrogenase as a critical mediator of retinoic acid synthesis from vitamin A in the mouse embryo. *J Nutr*, **128**, 459S-462S, 1998.
- Duester G. Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function: production of visual pigment and retinoic acid. *Eur J Biochem*, **267**, 4315-4324, 2000.
- Duester G. Genetic dissection of retinoid dehydrogenases. *Chem Biol Interact*, **130-132**, 469-480, 2001.
- Duester G, Mic FA, Molotkov A. Cytosolic retinoid dehydrogenases govern ubiquitous metabolism of retinol to retinaldehyde followed by tissue-specific metabolism to retinoic acid. *Chem Biol Interact*, **143-144**, 201-210, 2003.
- Dugué M, Neugroschl J, Sewell M, Marin D. Review of dementia. *Mt Sinai J Med*, **70**, 45-53, 2003.
- Dumont JE, Vassart G. Thyroid regulation. *Endocrinology*. (éd. DeGroot LJ, Besser M, Burger HG, et coll., Philadelphia: WB Saunders) 3<sup>ème</sup> édition, 543-559, 1995.
- Duprez E, Lillehaug JR, Gaub MP, Lanotte M. Differential changes of retinoid-X-receptor (RXR alpha) and its RAR alpha and PML-RAR alpha partners induced by retinoic acid and cAMP distinguish maturation sensitive and resistant t(15;17) promyelocytic leukemia NB4 cells. *Oncogene*, **12**, 2443-2450, 1996.
- Elmlinger MW, Dengler T, Weinstock C, Kuehnel W. Endocrine alterations in the aging male. *Clin Chem Lab Med*, **41**, 934-941, 2003.
- Encinas M, Iglesias M, Liu Y, Wang H, Muhaisen A, Cena V, Gallego C, Comella JX. Sequential treatment of SH-SY5Y cells with retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor-dependent, human neuron-like cells. *J Neurochem*, **75**, 991-1003, 2000.
- Enderlin V., Pallet V., Alfons S., Dargelos E., Jaffard R., Garcin H., Higuieret P. Age-related decreases in mRNA for brain nuclear receptors and target genes are reversed by retinoic acid treatment. *Neurosci Lett*, **229**, 115-129, 1997a.
- Enderlin V, Alfons S, Pallet V, Garcin H, Azais-Braesco V, Jaffard R, Higuieret P. 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**, 629-632, 1997b.

- Eravci M, Pinna G, Meinhold H, Baumgartner A. Effects of pharmacological and nonpharmacological treatments on thyroid hormone metabolism and concentrations in rat brain. *Endocrinology*, **141**, 1027-1040, 2000.
- Etchamendy N, Enderlin V, Marighetto A, Vouimba RM, Pallet V, Jaffard R, Higuieret P. Alleviation of a selective age-related relational memory deficit in mice by pharmacologically induced normalization of brain retinoid signaling. *J Neurosci*, **21**, 6423-6429, 2001.
- Etchamendy N, Enderlin V, Marighetto A, Pallet V, Higuieret P, Jaffard R. Vitamin A deficiency and relational memory deficit in adult mice: relationships with changes in brain retinoid signalling. *Behav Brain Res*, **145**, 37-49, 2003.
- Expertise collective de l'INSERM. *Alcool. Effets sur la santé*. (éd. Inserm), 2001.
- Fadda F, Rossetti ZL. Chronic ethanol consumption: from neuroadaptation to neurodegeneration. *Prog Neurobiol*, **56**, 385-431, 1998.
- Farooqui SM Induction of adenylate cyclase sensitive dopamine D2-receptors in retinoic acid induced differentiated human neuroblastoma SHSY-5Y cells. *Life Sci*, **55**, 1887-1893, 1994.
- Fedorov NB, Pasinelli P, Oestreicher AB, De Graam PNE, Reymann KG. Antibodies to postsynaptic PKC substrate neurogranin prevent long-term potentiation in hippocampal CA1 neurons. *Eur J Neurosci*, **7**, 819-822, 1995.
- Fernandez-Sola J, Villegas E, Nicolas JM, Deulofeu R, Antunez E, Sacanella E, Estruch R, Urbano-Marquez A. Serum and muscle levels of alpha-tocopherol, ascorbic acid, and retinol are normal in chronic alcoholic myopathy. *Alcohol Clin Exp Res*, **22**, 422-427, 1998.
- Finucane P, Anderson C. Thyroid disease in older patients. Diagnosis and treatment. *Drugs Aging*, **6**, 268-77, 1995.
- Fiorentini C, Facchetti M, Finardi A, Sigala S, Paez-Pereda M, Sher E, Spano P, Missale C. Nerve growth factor and retinoic acid interactions in the control of small cell lung cancer proliferation. *Eur J Endocrinol*, **147**, 371-379, 2002.
- Flamant F, Samarut J. Thyroid hormone receptors: lessons from knockout and knock-in mutant mice. *Trends Endocrinol Metab*, **14**, 85-90, 2003.
- Frank O, Luisada-Opper A, Sorrell MF, Zetterman R, Baker H. Effects of a single intoxicating dose of ethanol on the vitamin profile of organelles in rat liver and brain. *J Nutr*, **106**, 606-614, 1976.
- Friedrich P, Fesus L, Tarcsa E, Czeh G. Protein cross-linking by transglutaminase induced in long-term potentiation in the CA1 region of hippocampal slices. *Neuroscience*, **43**, 331-334, 1991.
- Fuller PJ. The steroid receptor family: mechanism of diversity. *FASEB J*, **5**, 3092-3099, 1991.
- Gaetano C, Matsumoto K, Thiele CJ. In vitro activation of distinct molecular and cellular phenotypes after induction of differentiation in a human neuroblastoma cell line. *Cancer Res*, **52**, 4402-4407, 1992.
- Galter D, Carmine A, Buervenich S, Duyster G, Olson L. Distribution of class I, III and IV alcohol dehydrogenase mRNAs in the adult rat, mouse and human brain. *Eur J Biochem*, **270**, 1316-1326, 2003.
- Garcia-Fernandez LF, Iniguez MA, Rodriguez-Pena A, Munoz A, Bernal J. Brain-specific prostaglandin D2 synthetase mRNA is dependent on thyroid hormone during rat brain development. *Biochem Biophys Res Commun*, **196**, 396-401, 1993.



- Gelman L, Staels B, Auwerx J. Rôle des cofacteurs transcriptionnels dans la transduction des signaux hormonaux par les récepteurs nucléaires. *Méd Sci*, **13**, 961-970, 1997.
- Gerendasy D.D., and Sutcliffe J.G. RC3/ Neurogranine, a post-synaptique calpacitin for setting the reponse threshold to calcium influxes. *Mol Neurobiol*, **15**, 131-163, 1997.
- Gerges NZ, Stringer JL, Alkadhi KA. Combination of hypothyroidism and stress abolishes early LTP in the CA1 but not dentate gyrus of hippocampus of adult rats. *Brain Res*, **922**, 250-260, 2001.
- Giannini G, Dawson MI, Zhang X, Thiele CJ. Activation of three distinct RXR/RAR heterodimers induces growth arrest and differentiation of neuroblastoma cells. *J Biol Chem*, **272**, 26693-26701, 1997.
- Giardino L, Ceccatelli S, Hokfelt T, Calza L. Expression of enkephalin and dynorphin precursor mRNAs in brain areas of hypo- and hyperthyroid rat: effect of kainic acid injection. *Brain Res*, **687**, 83-93, 1995.
- Giguere V. Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins: complex interplay in retinoid signaling. *Endocr Rev*, **15**, 61-79, 1994.
- Giguere V. Les récepteurs nucléaires orphelins: régulateurs essentiels du développement, de l'organogénèse et de l'homéostasie. *Méd Sci*, **13**, 459-466, 1997.
- Gilbert ME. Alterations in synaptic transmission and plasticity in area CA1 of adult hippocampus following developmental hypothyroidism. *Brain Res Dev Brain Res*, **148**, 11-18, 2004.
- Golovko AI, Golovko SI, Leontieva LV, Zefirov SY. The influence of ethanol on the functional status of GABA(A) receptors. *Biochemistry (Mosc)*, **67**, 719-729, 2002.
- Goodman AB. Three independent lines of evidence suggest retinoids as causal to schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 7240-7244, 1998.
- Goodman AB, Pardee AB. Evidence for defective retinoid transport and function in late onset Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, **100**, 2901-2905, 2003.
- Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, Bornert JM, Argos P, Chambon P. Human estrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature*, **320**, 134-139, 1986.
- Grummer MA, Erdman JW Jr. Effect of chronic alcohol consumption and moderate fat diet on vitamin A status in rats fed either vitamin a or beta-carotene. *J Nutr*, **113**, 350-364, 1983.
- Grummer MA, Zachman RD. Prenatal ethanol consumption alters the expression of cellular retinol binding protein and retinoic acid receptor mRNA in fetal rat embryo and brain. *Alcohol Clin Exp Res*, **19**, 1376-1381, 1995.
- Grummer MA, Salih ZN, Zachman RD. Effect of retinoic acid and ethanol on retinoic acid receptor beta and glial fibrillary acidic protein mRNA expression in human astrocytoma cells. *Neurosci Lett*, **294**, 73-76, 2000.
- Grummer MA, Zachman RD. Interaction of ethanol with retinol and retinoic acid in RAR beta and GAP-43 expression. *Neurotoxicol Teratol*, **22**, 829-836, 2000.
- Guadaño-Ferraz A, Escamez MJ, Morte B, Vargiu P, Bernal J. Transcriptional induction of RC3/neurogranin by thyroid hormone: differential neuronal sensitivity is not correlated with thyroid hormone receptor distribution in the brain. *Brain Res Mol Brain Res*, **49**, 37-44, 1997.

- Guilland JC, Costa de Carvalho MJ, Moreau D, Boggio V, Lhuissier M, Fuchs F. Interrelationships of alcohol intake with blood vitamin status in nonalcoholic subjects. *Nutr Res*, **14**, 1317-1330, 1994.
- Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*, **25**, 585-621, 1961.
- Hegedus L, Rasmussen N, Ravn V, Kastrup J, Krogsgaard K, Aldershvile J. Independent effects of liver disease and chronic alcoholism on thyroid function and size: the possibility of a toxic effect of alcohol on the thyroid gland. *Metabolism*, **37**, 229-233, 1988.
- Heicklen-Klein A, Aronov S, Ginzburg I. Tau promoter activity in neuronally differentiated P19 cells. *Brain Res*, **874**, 1-9, 2000.
- Heinz A, Bauer M, Kuhn S, Kruger F, Graf KJ, Rommelspacher H, Schmidt LG. Long-term observation of the hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis in alcohol-dependent patients. *Acta Psychiatr Scand*, **93**, 470-61996.
- Helander A. Biological markers in alcoholism. *J Neural Transm Suppl*, **66**, 15-32, 2003.
- Hennemann G, Docter R, Friesema EC, de Jong M, Krenning EP, Visser TJ. Plasma membrane transport of thyroid hormones and its role in thyroid hormone metabolism and bioavailability. *Endocr Rev*, **22**, 451-476, 2001.
- Hermann D, Heinz A, Mann K. Dysregulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis in alcoholism. *Addiction*, **97**, 1369-1381, 2002.
- Herr FM, Li E, Weinberg RB, Cook VR, Storch J. Differential mechanisms of retinoid transfer from cellular retinol binding proteins types I and II to phospholipid membranes. *J Biol Chem*, **274**, 9556-9563, 1999.
- Heyman RA, Mangelsdorf DJ, Dyck JA, Stein RB, Eichele G, Evans RM, Thaller C. 9-cis retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor. *Cell*, **68**, 397-406, 1992
- Hodin RA, Lazar MA, Wintman BI, Darling DS, Koenig RJ, Larsen PR, Moore DD, Chin WW. Identification of a thyroid hormone receptor that is pituitary-specific. *Science*, **244**, 76-79, 1989.
- Hollenberg SM, Weinberger C, Ong ES, Cerelli G, Oro A, Lebo R, Thompson EB, Rosenfeld MG, Evans RM. Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature*, **318**, 635-641, 1985.
- Hulo S, Alberi S, Laux T, Muller D, Caroni P. A point mutant of GAP-43 induces enhanced short-term and long-term hippocampal plasticity. *Eur J Neurosci*, **15**, 1976-1982, 2002.
- Husson M, Enderlin V, Alfos S, Feart C, Higuieret P, Pallet V. 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, 2003.
- Husson M, Enderlin V, Alfos S, Boucheron C, Pallet V, and Higuieret P. Expression of neurogranin and neuromoduline is affected in the striatum of vitamin A-deprived rats, *Molecular Brain research*, **123**, 7-17, 2004.
- Ikegaya Y, Ishizaka Y, Matsuki N. BDNF attenuates hippocampal LTD via activation of phospholipase C: implications for a vertical shift in the frequency-response curve of synaptic plasticity. *Eur J Neurosci*, **16**, 145-148, 2002.

- Im MJ, Russell MA, Feng JF. Transglutaminase II: a new class of GTP-binding protein with new biological functions. *Cell Signal*, **9**, 477-482, 1997.
- Iñiguez MA, Rodriguez-Peña A, Ibarrola N, Aguilera M, Muñoz A, Bernal J. Thyroid hormone regulation of RC3, a brain-specific gene encoding a protein kinase-C substrate. *Endocrinology*, **133**, 467-473, 1993.
- Iñiguez M.A., Morte B, Rodriguez-Peña A., Muñoz A., Gerendasy D., Sutcliffe J.G., Bernal J. Characterization of the promoter region and flanking sequences of the neuron-specific gene RC3 (neurogranin). *Mol Brain Res*, **27**, 205-214, 1994.
- Ishikawa T, Umesono K, Mangelsdorf DJ, Aburatani H, Stanger BZ, Shibasaki Y, Imawari M, Evans RM, Takaku F. A functional retinoic acid receptor encoded by the gene on human chromosome 12. *Mol Endocrinol*, **4**, 837-844, 1990.
- Israel Y, Videla L, Macdonald A, Bernstein J. Metabolic alterations produced in the liver by chronic ethanol administration: comparison between the effects produced by ethanol and by thyroid hormones. *Biochem J*, **134**, 523-529, 1973.
- Israel Y, Videla L, Bernstein J. Liver hypermetabolic state after chronic ethanol consumption: hormonal interrelation and pathogenic implications. *Fed Proc*, **34**, 2052-2059, 1975.
- Izumo S, Mahdavi V. Thyroid hormone receptor alpha isoforms generated by alternative splicing differentially activate myosin HC gene transcription. *Nature*, **334**, 539-542, 1988.
- Jang MH, Shin MC, Jung SB, Lee TH, Bahn GH, Kwon YK, Kim EH, Kim CJ. Alcohol and nicotine reduce cell proliferation and enhance apoptosis in dentate gyrus. *Neuroreport*, **13**, 1509-1513, 2002.
- Joffe RT, Sokolov ST. Thyroid hormones, the brain, and affective disorders. *Crit Rev Neurobiol*, **8**, 45-63, 1994.
- Jones KE, Yaffe BM, Chin WW. Regulation of thyroid hormone receptor beta-2 mRNA levels by retinoic acid. *Mol Cell Endocrinol*, **91**, 113-118, 1993.
- Kandel ER, Pittenbergh C. The past, the future and the biology of memory storage. *Philos T Roy Soc Lond B Biol Sci*, **354**, 2027-2052, 1999.
- Kaptein EM. Hormone-specific alterations of T4, T3, and reverse T3 metabolism with recent ethanol abstinence in humans. *Am J Physiol*, **272**, E191-200, 1997.
- Kastner P, Mark M, Ghyselinck N, Krezel W, Dupé V, Grondona JM, Chambon P. Genetic evidence that the retinoid signal is transduced by heterodimeric RXR/RAR functional units during mouse development. *Development*, **124**, 313-326, 1997.
- Kato S, Mano H, Kumazawa T, Yoshizawa Y, Kojima R, Masushige S. Effect of retinoid status on alpha, beta and gamma retinoic acid receptor mRNA levels in various rat tissues. *Biochem J*, **286**, 755-760, 1992.
- Katzenellenbogen JA, O'Malley BW, Katzenellenbogen BS. 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**, 119-131, 1996.
- Kessova I, Cederbaum AI. CYP2E1: biochemistry, toxicology, regulation and function in ethanol-induced liver injury. *Curr Mol Med*, **3**, 509-518, 2003.
- Kim SY, Jeitner TM, Steinert PM. Transglutaminases in disease. *Neurochem Int*, **40**, 85-103, 2002.

- Knudsen N, Bulow I, Laurberg P, Perrild H, Ovesen L, Jorgensen T. Alcohol consumption is associated with reduced prevalence of goitre and solitary thyroid nodules. *Clin Endocrinol (Oxf)*, **55**, 41-46, 2001.
- Kobayashi M, Matsuoka I, Kurihara K. 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, 1994.
- Koenig RJ, Lazar MA, Hodin RA, Brent GA, Larsen PR, Chin WW, Moore DD. Inhibition of thyroid hormone action by a non-hormone binding c-erbA protein generated by alternative mRNA splicing. *Nature*, **337**, 659-661, 1989.
- Koide A, Abbatiello S, Rothgery L, Koide S. Probing protein conformational changes in living cells by using designer binding proteins: application to the estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, **99**, 1253-1258, 2002.
- Koller KJ, Wolff RS, Warden MK, Zoeller RT. Thyroid hormones regulate levels of thyrotropin-releasing-hormone mRNA in the paraventricular nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 7329-7333, 1987.
- Krazem A, Marighetto A, Higuieret P, Jaffard R. Age-dependent effects of moderate chronic ethanol administration on different forms of memory expression in mice. *Behav Brain Res*, **147**, 17-29, 2003a.
- Krazem A, Mons N, Higuieret P, Jaffard R. Chronic ethanol consumption restores the age-related decrease in neurogranin mRNA level in the hippocampus of mice. *Neurosci Lett*, **338**, 62-66, 2003b.
- Krezel W, Ghyselinck N, Samad TA, Dupe V, Kastner P, Borrelli E, Chambon P. Impaired locomotion and dopamine signaling in retinoid receptor mutant mice. *Science*, **279**, 863-867, 1998.
- Krezel W, Kastner P, Chambon P. Differential expression of retinoid receptors in the adult mouse central nervous system. *Neuroscience*, **89**, 1291-300, 1999.
- Kurlandsky SB, Gamble MV, Ramakrishnan R, Blaner WS. Plasma delivery of retinoic acid to tissues in the rat. *J Biol Chem*, **270**, 17850-17857, 1995.
- Lazar MA. Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities. *Endocr Rev*, **14**, 184-193, 1993.
- Lebel JM, L'Herault S, Dussault JH, Puymirat J. Thyroid hormone up-regulates thyroid hormone receptor beta gene expression in rat cerebral hemisphere astrocyte cultures. *Glia*, **9**, 105-112, 1993.
- Leclere J, Orgiazzi J, Rousset B, Schlienger JL, Wemeau JL. *La thyroïde*. (Expansion Scientifique française), 1992.
- Le Doze F, Debruyne D, Albessard F, Barre L, Defer GL. Pharmacokinetics of all-trans retinoic acid, 13-cis retinoic acid, and fenretinide in plasma and brain of Rat. *Drug Metab Dispos*, **28**, 205-208, 2000.
- Lee JW, Ryan F, Swaffield JC, Johnston SA, Moore DD. Interaction of thyroid-hormone receptor with a conserved transcriptional mediator. *Nature*, **374**, 91-94, 1995.
- Lee PR, Brady D, Koenig JL. Thyroid hormone regulation of N-methyl-D-aspartic acid receptor subunit mRNA expression in adult brain. *J Neuroendocrinol*, **15**, 87-92, 2003.
- Leo MA, Iida S, Lieber CS. Retinoic acid metabolism by a system reconstituted with cytochrome P-450. *Arch Biochem Biophys*, **234**, 305-312, 1984.

- Leo MA, Kim C, Lieber CS. Increased vitamin A in esophagus and other extrahepatic tissues after chronic ethanol consumption in the rat. *Alcohol Clin Exp Res*, **10**, 487-492, 1986.
- Leo MA, Kim CI, Lowe N, Lieber CS. Increased hepatic retinal dehydrogenase activity after phenobarbital and ethanol administration. *Biochem Pharmacol*, **38**, 97-103, 1989.
- Leo MA, Lieber CS. Alcohol, vitamin A, and beta-carotene: adverse interactions, including hepatotoxicity and carcinogenicity. *Am J Clin Nutr*, **69**, 1071-1085, 1999.
- Leonard L, Horton C, Maden M, Pizzey JA. Anteriorization of CRABP-I expression by retinoic acid in the developing mouse central nervous system and its relationship to teratogenesis. *Dev Biol*, **168**, 514-528, 1995.
- Leroy P, Nakshatri H, Chambon P. Mouse retinoic acid receptor alpha 2 isoform is transcribed from a promoter that contains a retinoic acid response element. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 10138-10142, 1991.
- Lesort M, Tucholski J, Miller ML, Johnson GV. Tissue transglutaminase: a possible role in neurodegenerative diseases. *Prog Neurobiol*, **61**, 439-463, 2000.
- Levin AA, Sturzenbecker LJ, Kazmer S, Bosakowski T, Huselton C, Allenby G, Speck J, Kratzeisen C, Rosenberger M, Lovey A, et al. 9-cis retinoic acid stereoisomer binds and activates the nuclear receptor RXR alpha. *Nature*, **355**, 359-361, 1992.
- Lidén M, Tryggvason K, Eriksson U. Structure and function of retinol dehydrogenases of the short chain dehydrogenase/reductase family. *Mol Aspects Med*, **24**, 403-409, 2003.
- Lieber CS. Cytochrome P-4502E1: its physiological and pathological role. *Physiol Rev*, **77**, 517-544, 1997.
- Lieber CS, Abittan CS. Pharmacology and metabolism of alcohol, including its metabolic effects and interactions with other drugs. *Clin Dermatol*, **17**, 365-379, 1999.
- Lindholm D, Castren E, Tsoulfas P, Kolbeck R, Berzaghi Mda P, Leingartner A, Heisenberg CP, Tessarollo L, Parada LF. Neurotrophin-3 induced by tri-iodothyronine in cerebellar granule cells promotes Purkinje cell differentiation. *J Cell Biol*, **122**, 443-450, 1993.
- Liu C, Russell RM, Seitz HK, Wang XD. Ethanol enhances retinoic acid metabolism into polar metabolites in rat liver via induction of cytochrome P4502E1. *Gastroenterology*, **120**, 179-189, 2001.
- Lohnes D, Mark M, Mendelsohn C, Dolle P, Dierich A, Gorry P, Gansmuller A, Chambon P. Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development (I). Craniofacial and skeletal abnormalities in RAR double mutants. *Development*, **120**, 2723-2748, 1994.
- Lorand L, Graham RM. Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**, 140-156, 2003.
- McCaffery P, Dräger UC. High levels of a retinoic acid-generating dehydrogenase in the meso-telencephalic dopamine system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 7772-7776, 1994.
- McCaffery P, Dräger UC. Retinoic acid synthesizing enzymes in the embryonic and adult vertebrate. *Adv Exp Med Biol*, **372** 173-183, 1995.
- McCaffery P, Dräger UC. Regulation of retinoic acid signaling in the embryonic nervous system: a master differentiation factor. *Cytokine Growth Factor Rev*, **11**, 233-249, 2000.

- Macchia PE, Jiang P, Yuan YD, Chandarardna RA, Weiss RE, Chassande O, Samarut J, Refetoff S, Burant CF. RXR receptor agonist suppression of thyroid function: central effects in the absence of thyroid hormone receptor. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **283**, E326-E331, 2002.
- McDonald PN, Bok D, Ong DE. Localization of cellular retinol-binding protein and retinol-binding protein in cells comprising the blood-brain barrier of rat and human. *Proc Natl Acad Sci USA*, **87**, 4265-4269, 1990.
- McLaren DS, Mawlayi Z, Downing A. Distribution of vitamin A in human liver. *Proc Nutr Soc*, **38**, 49A, 1979.
- Maden M, Hind M. Retinoic acid, a regeneration-inducing molecule. *Dev Dyn*, **226**, 237-244, 2003.
- Maggio N, Sellitti S, Capano CP, Papa M. Tissue-transglutaminase in rat and human brain: light and electron immunocytochemical analysis and in situ hybridization study. *Brain Res Bull*, **56**, 173-82, 2001.
- Magri F, Muzzoni B, Cravello L, Fioravanti M, Busconi L, Camozzi D, Vignati G, Ferrari E. Thyroid function in physiological aging and in centenarians: possible relationships with some nutritional markers. *Metabolism*, **51**, 105-109, 2002.
- Mahley RW, Hussain MM. Chylomicron and chylomicron remnant catabolism. *Curr Opin Lipidol*, **2**, 170-176, 1991.
- Malik MA, Blusztajn JK, Greenwood CE. Nutrients as trophic factors in neurons and the central nervous system: role of retinoic acid. *J Nutr Biochem*, **11**, 2-13, 2000.
- Mangelsdorf DJ, Evans RM. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell*, **83**, 841-50, 1995.
- Mano H, Ozawa T, Takeyama K, Yoshizawa Y, Kojima R, Kato S, Masushige S. Thyroid hormone affects the gene expression of retinoid X receptors in the adult rat. *Biochem Biophys Res Commun*, **191**, 943-949, 1993.
- Marighetto A, Etchamendy N, Touzani K, Cortes Torrea C, Yee BK, Rawlins JN, Jaffard R. Knowing which and knowing what: a potential mouse model for age-related human declarative memory decline. *Eur J Neurosci*, **11**, 3312-3322, 1999.
- Marill J, Idres N, Capron CC, Nguyen E, Chabot GG. Retinoic acid metabolism and mechanism of action: a review. *Curr Drug Metab*, **4**, 1-10, 2003.
- Martel J, Cayrou C, Puymirat J. Identification of new thyroid hormone-regulated genes in rat brain neuronal cultures. *Neuroreport*, **13**, 1849-1851, 2002.
- Martin JV, Williams DB, Fitzgerald RM, Im HK, Vonvoigtlander PF. Thyroid hormonal modulation of the binding and activity of the GABAA receptor complex of brain. *Neuroscience*, **73**, 705-713, 1996.
- Martinez de Arrieta C, Morte B, Coloma A, Bernal J. The human RC3 gene homolog, NRG1 contains a thyroid hormone-responsive element located in the first intron. *Endocrinology*, **140**, 335-343, 1999.
- Martinez SE, Vaglenova J, Sabria J, Martinez MC, Farres J, Pares X. Distribution of alcohol dehydrogenase mRNA in the rat central nervous system. Consequences for brain ethanol and retinoid metabolism. *Eur J Biochem*, **268**, 5045-5056, 2001.
- Masson GA, Walker CH, Prange AJ. L-triiodothyronine: is this peripheral hormone a central neurotransmitter? *Neuropsychopharmacol*, **8**, 253-258, 1993.

- Meier-Heusler S, Pernin A, Liang H, Goumaz MO, Burger AG, Meier CA. Quantitation of beta 1 triiodothyronine receptor mRNA in human tissues by competitive reverse transcription polymerase chain reaction. *J Endocrinol Invest*, **18**, 767-773, 1995.
- Mendelsohn C, Lohnes D, Decimo D, Lufkin T, LeMeur M, Chambon P, Mark M. Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development (II). Multiple abnormalities at various stages of organogenesis in RAR double mutants. *Development*, **120**, 2749-2771, 1994.
- Meunier JM, Shvaloff A. *Neurotransmetteurs*. Abrégés Masson, 2<sup>ème</sup> éd, 1995.
- Mey J, Rombach N. Retinoic acid increases BDNF-dependent regeneration of chick retinal ganglion cells in vitro. *Neuroreport*, **10**, 3573-3577, 1999.
- Mey J, Hammelmann S. OLN-93 oligodendrocytes synthesize all-trans-retinoic acid in vitro. *Cell Tissue Res*, **302**, 49-58, 2000.
- Mezey E, Holt PR. The inhibitory effect of ethanol on retinol oxidation by human liver and cattle retina. *Exp Mol Pathol*, **15**, 148-156, 1971.
- Miesfield R, Rusconi S, Godowski PJ, Maler BA, Okret S, Wilkström AC, Gustafsson J Å, Yamamoto KR. Genetic complementation of a glucocorticoid receptor deficiency by expression of cloned receptor cDNA. *Cell*, **68**, 389-399, 1986.
- Mignotte V. Les doigts de zinc (2): les récepteurs hormonaux nucléaires. *Hématologie*, **4**, 351-353, 1997.
- Misner DL, Jacobs S, Shimizu Y, de Urquiza AM, Solomin L, Perlmann T, De Luca LM, Stevens CF, Evans RM. Vitamin A deprivation results in reversible loss of hippocampal long-term synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci USA*, **98**, 11714-11719, 2001.
- Mobarhan S, Seitz HK, Russell RM, Mehta R, Hupert J, Friedman H, Layden TJ, Meydani M, Langenberg P. Age-related effects of chronic ethanol intake on vitamin A status in Fisher 344 rats. *J Nutr*, **121**, 510-517, 1991.
- Mons N, Enderlin V, Jaffard R, Higuieret P. Selective age-related changes in the PKC-sensitive, calmodulin-binding protein, neurogranin, in the mouse brain. *J Neurochem*, **79**, 859-867, 2001.
- Monzani F, Del Guerra P, Caraccio N, Del Corso L, Casolaro A, Mariotti S, Pentimone F. Age-related modifications in the regulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. *Horm Res*, **46**, 107-112, 1996.
- Mooradian AD, Wong NC. Age-related changes in thyroid hormone action. *Eur J Endocrinol*, **131**, 451-461, 1994.
- Mooradian AD. Normal age-related changes in thyroid hormone economy. *Clin Geriatr Med*, **11**, 159-69, 1995.
- Moreno S, Farioli-Vecchiolo S, Cerù MP. Immunolocalization of peroxisome proliferator-activated receptors and retinoid X receptors in the adult rat CNS. *Neuroscience*, **123**, 131-145, 2004.
- Muñoz A, Rodriguez-Pena A, Perez-Castillo A, Ferreiro B, Sutcliffe JG, Bernal J. Effects of neonatal hypothyroidism on rat brain gene expression. *Mol Endocrinol* ; **5**, 273-280, 1991.
- Nagy L, Saydak M, Shipley N, Lu S, Basilion JP, Yan ZH, Syka P, Chandraratna RAS, Stein JP, Heyman RA, Davies PJA. Identification and characterization of versatile retinoic response element (retinoic acid receptor response element-retinoid X receptor response element) in the mouse tissue transglutaminase gene promoter. *J Biol Chem*, **234**, 435-440, 1996.

- Nanni G, Canepa C, Casu A. Dolichol and vitamin A content in rat liver Ito (perisinusoidal) cells. *Life Sci*, **60**, 21-28, 1997.
- Napoli JL. Retinoic acid biosynthesis and metabolism. *FASEB*, **10**, 993-1001, 1996.
- Napoli JL. Retinoic acid: its biosynthesis and metabolism. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **63**, 139-188, 1999.
- Newcomer ME, Ong DE. Plasma retinol binding protein: structure and function of the prototypic lipocalin. *Biochim Biophys Acta*, **1482**, 57-64, 2000.
- Noy N. Retinoid-binding proteins: mediators of retinoid action. *Biochem J*, **348**, 481-495, 2000.
- Nuclear Receptor Committee. A unified Nomenclature System for the Nuclear Receptor Subfamily. *Cell*, **97**, 161-163, 1999.
- Orrego H, Blake JE, Blendis LM, Compton KV, Israel Y. Long-term treatment of alcoholic liver disease with propylthiouracil. *N Engl J Med*, **317**, 1421-1427, 1987.
- Orrego H, Blake JE, Blendis LM, Compton KV, Volpe R, Israel Y. Long-term treatment of alcoholic liver disease with propylthiouracil. Part 2: Influence of drop-out rates and of continued alcohol consumption in a clinical trial. *J Hepatol*, **20**, 343-349, 1994.
- Paille F. Evaluation pratique de la consommation d'alcool : classifications et définitions des conduites d'alcoolisation, *Gastroenterol Clin Biol*, **26**, B141-B148, 2002.
- 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-dependent protein kinase II, synaptic plasticity, and spatial learning: a study with knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, **97**, 11232-11237, 2000.
- Pallet V, Coustaut M, Naulet F, Higuieret D, Garcin H, Higuieret P. Chronic ethanol administration enhances retinoic acid and triiodothyronine receptor expression in mouse liver. *FEBS Lett*, **331**, 119-122, 1993.
- Pallet V, Azais-Braesco V, Enderlin V, Grolier P, Noel-Suberville C, Garcin H, Higuieret P. 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**, 123-136, 1997.
- Paradies MA, Steward O. Multiple subcellular mRNA distribution patterns in neurons: a nonisotopic in situ hybridization analysis. *J Neurobiol*, **33**, 473-493, 1997.
- Parrado A, Despouy G, Kraiba R, Le Pogam C, Dupas S, Choquette M, Robledo M, Larghero J, Bui H, Le Gall I, Rochette-Egly C, Chomienne C, Padua RA. Retinoic acid receptor alpha variants, RARalpha1DeltaB and RARalpha1DeltaBC, define a new class of nuclear receptor isoforms. *Nucleic Acids Res*, **29**, 4901-4908, 2001.
- Perez-Juste G, Garcia-Silva S, Aranda A. An element in the region responsible for premature termination of transcription mediates repression of c-myc gene expression by thyroid hormone in neuroblastoma cells. *J Biol Chem*, **275**, 1307-1314, 2000.
- Petkovitch M, Brand NJ, Krust A, Chambon P. A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors. *Nature*, **330**, 444-450, 1987.
- Pinaire J, Chou WY, Morton M, You M, Zeng Y, Cho WK, Galli A, Everett L, Breen H, Dumauval N, Smith JR, Crabb D. Identification of a retinoid receptor response element in the human aldehyde dehydrogenase-2 promoter. *Alcohol Clin Exp Res*, **27**, 1860-1866, 2003.



- Piontek J, Regnier-Vigouroux A, Brandt R. Contact with astroglial membranes induces axonal and dendritic growth of human CNS model neurons and affects the distribution of the growth-associated proteins MAP1B and GAP43. *J Neurosci Res*, **67**, 471-483, 2002.
- Plum LA, Clagett-Dame M. 9-*cis* retinoic acid selectively activates the cellular retinoic acid binding protein-II gene in human neuroblastoma cells. *Arch Biochem Biophys*, **319**, 457-463, 1995.
- Poguet AL, Legrand C, Feng X, Yen PM, Meltzer P, Samarut J, Flamant F. Microarray analysis of knockout mice identifies cyclin D2 as a possible mediator for the action of thyroid hormone during the postnatal development of the cerebellum. *Dev Biol*, **254**, 188-199, 2003.
- Prince DJ, Carlone RL. Retinoic acid involvement in the reciprocal neurotrophic interactions between new spinal cord and limb blastemas in vitro. *Brain Res Dev Brain Res*, **140**, 67-73, 2003.
- Puymirat J, Miehe M, Marchand R, Sarlieve L, Dussault JH. Immunocytochemical localization of thyroid hormone receptors in the adult rat brain. *Thyroid*, **1**, 173-184, 1991.
- Quadro L, Hamberger L, Colantuoni V, Gottesman ME, Blaner WS. Understanding the physiological role of retinol-binding protein in vitamin A metabolism using transgenic and knockout mouse models. *Mol Aspects Med*, **24**, 421-430, 2003.
- Quattrone A, Pascale A, Nogues X, Zhao W, Gusev P, Pacini A, Alkon DL. Posttranscriptional regulation of gene expression in learning by the neuronal ELAV-like mRNA-stabilizing proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, **98**, 11668-11673, 2001.
- Quick TC, Ong DE. Vitamin A metabolism in the human intestinal Caco-2 cell line. *Biochemistry*, **29**, 11116-11123, 1990.
- Ramakers GM, Pasinelli P, van Beest M, van der Slot A, Gispen WH, De Graan PN. Activation of pre- and postsynaptic protein kinase C during tetraethylammonium-induced long-term potentiation in the CA1 field of the hippocampus. *Neurosci Lett*, **286**, 53-56, 2000.
- Raner GM, Vaz AD, Coon MJ. Metabolism of all-trans, 9-*cis*, and 13-*cis* isomers of retinal by purified isozymes of microsomal cytochrome P450 and mechanism-based inhibition of retinoid oxidation by citral. *Mol Pharmacol*, **49**, 515-522, 1996.
- Rastenejad F. Retinoid X receptor and its partners in the nuclear receptor family. *Curr Opin Struct Biol*, **11**, 33-38, 2001.
- Redonnet A, Bonilla S, Noël-Suberville C, Pallet V, Dabadie H, Gin H, Higuieret P. relationship between peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoic acid receptor alpha gene expression in obese human adipose tissue. *Int J of Obesity*, **26**, 920-927, 2002.
- Refetoff S, Nicoloff JT. Thyroid hormone transport and metabolism. *Endocrinology*. (éd. DeGroot LJ, Besser M, Burger HG, et coll.; Philadelphia: WB Saunders) **3<sup>ème</sup>** édition, 560-582, 1995.
- Ritchie JW, Shi YB, Hayashi Y, Baird FE, Muchekeh RW, Christie GR, Taylor PM. A role for thyroid hormone transporters in transcriptional regulation by thyroid hormone receptors. *Mol Endocrinol*, **17**, 653-661, 2003.
- Roberto M, Nelson TE, Ur CL, Brunelli M, Sanna PP, Gruol DL. The transient depression of hippocampal CA1 LTP induced by chronic intermittent ethanol exposure is associated with an inhibition of the MAP kinase pathway. *Eur J Neurosci*, **17**, 1646-1654, 2003.

- Rosales FJ, Ross AC. A low molar ratio of retinol binding protein to transthyretin indicates vitamin A deficiency during inflammation: studies in rats and a posterior analysis of vitamin A-supplemented children with measles. *J Nutr*, **128**, 1681-1687, 1998.
- Rosenfeld MG, Glass CK. Coregulator codes of transcriptional regulation by nuclear receptors. *J Biol Chem*, **276**, 36865-36868, 2001.
- Rosenzweig ES, Barnes CA. Impact of aging on hippocampal function: plasticity, network dynamics, and cognition. *Prog Neurobiol*, **69**, 143-179, 2003.
- Ross AC, Zolfaghari R, Weisz J. Vitamin A: recent advances in the biotransformation, transport, and metabolism of retinoids. *Curr Opin Gastroenterol*, **17**, 184-192, 2001.
- Routtenberg A, Cantalops I, Zaffuto S, Serrano P, Namgung U. Enhanced learning after genetic overexpression of a brain growth protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, **97**, 7657-7662, 2000.
- Rowe A. Retinoid X receptors. *Int J Biochem Cell Biol*, **29**, 275-278, 1997.
- Ruberte E, Friederich V, Chambon P, Morriss-Kay G. Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins. III. Their differential transcript distribution during mouse nervous system development. *Development*, **118**, 2672-2682, 1993.
- Ruiz A, Winston A, Lim YH, Gilbert BA, Rando RR, Bok D. Molecular and biochemical characterization of lecithin retinol acyltransferase. *J Biol Chem*, **274**, 3834-3841, 1999.
- Ryabinin AE, Miller MN, Durrant S. Effects of acute alcohol administration on object recognition learning in C57BL/6J mice. *Pharmacol Biochem Behav*, **71**, 307-312, 2002.
- Samad TA, Krezel W, Chambon P, Borrelli E. Regulation of dopaminergic pathways by retinoids: activation of the D2 receptor promoter by members of the retinoic acid receptor-retinoid X receptor family. *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**, 14349-14354, 1997.
- Samuels HH. Identification and characterization of thyroid hormone receptors and action using cell culture techniques. *Molecular basis of thyroid hormone action*. (éd. Oppenheimer JH, Samuels HH; Academic Press, N.Y.), 36-65, 1983.
- Sarkar S, Chaudhury S, Sarkar PK. Regulation of beta- and gamma-actin mRNA by thyroid hormone in the developing rat brain. *Neuroreport*, **8**, 1267-1271, 1997.
- Sato M, Lieber CS. Hepatic vitamin A depletion after chronic ethanol consumption in baboons and rats. *J Nutr*, **111**, 2015-2023, 1981.
- Sato M, Lieber CS. Changes in vitamin A status after acute ethanol administration in the rat. *J Nutr*, **112**, 1188-1196, 1982.
- Satoh J, Kuroda Y. 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, 2000.
- Satyanarayana M, Sarvesh A, Khadeer MA, Ved HS, Soprano DR, Rajeswari MR, Pieringer RA. Regulation of neuronal thyroid hormone receptor alpha 1 mRNA by hydrocortisone, thyroid hormone and retinoic acid. *Dev Neurosci*, **16**, 255-259, 1994.
- Scheibe RJ, Wagner JA. Retinoic acid regulates both expression of the nerve growth factor receptor and sensitivity to nerve growth factor. *J Biol Chem*, **267**, 17611-17616, 1992.

- Schinder AF, Poo M. The neurotrophin hypothesis for synaptic plasticity. *Trends Neurosci*, **23**, 639-645, 2000.
- Schoedel KA, Sellers EM, Tyndale RF. Induction of CYP2B1/2 and nicotine metabolism by ethanol in rat liver but not rat brain. *Biochem Pharmacol*, **62**, 1025-1036, 2001.
- Schröder M, Carlberg C. Thyroid hormone and retinoic acid receptors form heterodimers with retinoid X receptors on direct repeats, palindromes, and inverted palindromes. *DNA Cell Biol*, **13**, 333-341, 1994.
- Schreiber G, Aldred AR, Jaworowski A, Nilsson C, Achen MG, Segal MB. Thyroxine transport from blood to brain via transthyretin synthesis in choroid plexus. *Am J Physiol*, **258**, R338-R345, 1990.
- Scott HC, Sun GY, Zoeller RT. Prenatal ethanol exposure selectively reduces the mRNA encoding  $\alpha$ -1 thyroid hormone receptor in fetal rat brain. *Alcohol Clin Exp Res*, **22**, 2111-2117, 1998.
- Shakravarty B, Morley P, Whitfield J.  $Ca^{2+}$ -Calmodulin and protein kinase Cs : a hypothetical synthesis of their conflicting convergences on shared substrate domains. *TINS*, **22**, 12-16, 1999.
- Shen Y, Mani S, Donovan SL, Schwob JE, Meiri KF. Growth-associated protein-43 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system. *J Neurosci*, **22**, 239-247, 2002.
- Simon D, Körber C, Krausch M, Segering J, Groth P, Görges R, Grünwald F, Müller-Gärtner HW, Schmutzler C, Köhrle J, Röher HD, Reiners C. Clinical impact of retinoids in redifferentiation therapy of advanced thyroid cancer: final results of a pilot study. *Eur J Nucl Med*, **29**, 775-782, 2002.
- Singh US, Pan J, Kao YL, Joshi S, Young KL, Baker KM. Tissue transglutaminase mediates activation of RhoA and MAP kinase pathways during retinoic acid-induced neuronal differentiation of SH-SY5Y cells. *J Biol Chem* **278**, 391-399, 2003.
- Skrede B, Blomhoff R, Maelandsmo GM, Ose L, Myklebost O, Norum KR. Uptake of chylomicron remnant retinyl esters in human leukocytes in vivo. *Eur J Clin Invest*, **22**, 229-234, 1992.
- Smeland S, Bjerknes T, Malaba L, Eskild W, Norum KR, Blomhoff R. Tissue distribution of the receptor for plasma retinol-binding protein. *Biochem J*, **305**, 419-424, 1995.
- Smith JW, Evans AT, Costall B, Smythe JW. Thyroid hormones, brain function and cognition: a brief review. *Neurosci Biobehav Rev*, **26**, 45-60, 2002.
- Solomon DH. Effect of ageing on thyroid hormone metabolism. *Thyroid hormone metabolism regulation and clinical implications*, (éd. Wu SY Boston, USA: Blackwell Scientific Publications), 267-292, 1991.
- Soprano DR, Herbert J, Soprano KJ, Schon EA, Goodman DS. Demonstration of transthyretin mRNA in the brain and other extrahepatic tissues in the rat. *J Biol Chem*, **260**, 11793-11798, 1985.
- Spannaus-Martin DJ, Martin BL. In vitro effect of retinoids on calcineurin activity. *Biochem Pharmacol*, **60**, 803-808, 2000.
- Sporn MB, Roberts AB, Goodman DS. *The retinoids. Biology, Chemistry and Medicine*, 2<sup>th</sup> édition (New York: Raven Press), 1994.
- Stein TD, Johnson JA. Lack of neurodegeneration in transgenic mice overexpressing mutant amyloid precursor protein is associated with increased levels of transthyretin and the activation of cell survival pathways. *J Neurosci*, **22**, 7380-7388, 2002.

- Strait KA, Carlson DJ, Schwartz HL, Oppenheimer JH. Transient stimulation of myelin basic protein gene expression in differentiating cultured oligodendrocytes: A model for 3,5,3'-triiodothyronine-induced brain development. *Endocrinol*, **138**, 635-641, 1997.
- Sudaram M, Sivaprasadarao A, DeSousa MM, Findlay JB. The transfer of retinal from cellular retinal-binding protein is mediated by a membrane receptor. *J Biol Chem*, **273**, 3336-3342, 1998.
- Sullivan EV, Adalsteinsson E, Hedehus M, Ju C, Moseley M, Lim KO, Pfefferbaum A. Equivalent disruption of regional white matter microstructure in ageing healthy men and women. *Neuroreport*, **12**, 99-104, 2001.
- Sundboom J, Olson JA. Effect of aging on the storage and catabolism of vitamin A in mice. *Exp Gerontol*, **19**, 257-265, 1984.
- Szabova L, Macejova D, Dvorcakova M, Mostbock S, Blazickova S, Zorad S, Walrand S, Cardinault N, Vasson MP, Rock E, Brtko J. Expression of nuclear retinoic acid receptor in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of healthy subjects. *Life Sci*, **72**, 831-836, 2003.
- Tang YP, Ma SK, Lee EHY. MRNA differential display identification of thyroid hormone-responsive protein (THRP) gene in association with early phase of long-term potentiation. *Hippocampus*, **11**, 637-646, 2001.
- The 3C Study Group. Vascular factors and risk of dementia: design of the Three-City study and baseline characteristics of the study population. *Neuroepidemiology*, **22**, 316-325, 2003.
- Thompson CC. Thyroid hormone-responsive genes in developing cerebellum include a novel synaptotagmin and a hairless homolog. *J Neurosci*, **16**, 7832-7840, 1996.
- Toresson H, Mata de Urquiza A, Fagerstrom C, Perlmann T, Campbell K. Retinoids are produced by glia in the lateral ganglionic eminence and regulate striatal neuron differentiation. *Development*, **126**, 1317-1326, 1999.
- Tremont G, Stern RA, Westervelt HJ, Bishop CL, Davis JD. Neurobehavioral functioning in thyroid disorders. *Med Health R I*, **86**, 318-322, 2003.
- Troen BR. The biology of aging. *Mt Sinai J Med*, **70**, 3-22, 2003.
- Tucholski J, Lesort M, Johnson GV. Tissue transglutaminase is essential for neurite outgrowth in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neuroscience*, **102**, 481-491, 2001.
- Ullman MD, McCaffery P, Evans J, Koul O, McCluer RH. Ethanol increases cerebellar and decreases cortical retinoic acid concentration of postnatal rat brain. (Abstract) *Alcohol Clin Exp Res*, **22**, 55A, 1998.
- Umesono K, Murakami KK, Thompson CC, Evans RM. Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D3 receptors. *Cell*, **65**, 1255-1266, 1991.
- Upadhyya SC, Tirumalai PS, Boyd MR, Mori T, Ravindranath V. Cytochrome P4502E (CYP2E) in brain: constitutive expression, induction by ethanol and localization by fluorescence in situ hybridization. *Arch Biochem Biophys*, **373**, 23-34, 2000.
- Urade Y, Hayaishi O. Prostaglandin D synthase: structure and function. *Vitam Horm*, **58**, 89-120, 2000.
- Van der Loo B, Labugger R, Aebischer CP, Bachschmid M, Spitzer V, Kilo J, Altwegg L, Ullrich V, Luscher TF. Age-related changes of vitamin A status. *J Cardiovasc Pharmacol*, **43**, 26-30, 2004.

- Vargiu P, Morte B, Manzano J, Perez J, de Abajo R, Gregor Sutcliffe J, Bernal J. Thyroid hormone regulation of rhes, a novel Ras homolog gene expressed in the striatum. *Brain Res Mol Brain Res*, **94**, 1-8, 2001.
- Verma AK, Shoemaker A, Simsiman R, Denning M, Zachman RD. 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**, 2144-2152, 1992.
- Vieira AV, Schneider WJ. Transport and uptake of retinol during chicken oocyte growth. *Biochim Biophys Acta*, **1169**, 250-256, 1993.
- Vieira AV, Schneider WJ, Vieira PM. Retinoids: transport, metabolism, and mechanisms of action. *J Endocrinol*, **146**, 201-207, 1995.
- Wagner E, Luo T, Drager UC. Retinoic acid synthesis in the postnatal mouse brain marks distinct developmental stages and functional systems. *Cereb Cortex*, **12**, 1244-1253, 2002.
- Walmsley CM, Bates CJ, Prentice A, Cole TJ. Relationship between alcohol and nutrient intakes and blood status indices of older people living in the UK: further analysis of data from the National Diet and Nutrition Survey of people aged 65 years and over, 1994/5. *Public Health Nutr*, **1**, 157-167, 1998.
- Wan Y-J Y. Retinoic acid and its receptors. *Am J Surg*, **166**, 50-53, 1993.
- Wan YJ, Wang L, Wu TC. 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**, 56-61, 1994.
- Wang YZ, Christakos S. Retinoic acid regulates the expression of the calcium binding protein, calbindin-D28K. *Mol Endocrinol*, **9**, 1510-1521, 1995.
- Warner M, Gustafsson JA. Effect of ethanol on cytochrome P450 in the rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 1019-1023, 1994.
- Watson JB, Szijan I, Coulter PM 2<sup>nd</sup>. Localization of RC3 (neurogranin) in rat brain subcellular fractions. *Brain Res Mol Brain Res*, **27**, 323-328, 1994.
- Watson JB, Khorasani H, Persson A, Huang KP, Huang FL, O'Dell TJ. Age-related deficits in long-term potentiation are insensitive to hydrogen peroxide: coincidence with enhanced autophosphorylation of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Neurosci Res*, **70**, 298-308, 2002.
- Wei LN, Lee CH, Filipcik P, Chang L. Regulation of the mouse cellular retinoic acid-binding protein-I gene by thyroid hormone and retinoids in transgenic mouse embryos and P19 cells. *J Endocrinol*, **155**, 35-46, 1997.
- Weinberger C, Thompson CC, Ong ES, Lebo R, Gruol DJ, Evans RM. The c-erb-A gene encodes a thyroid hormone receptor. *Nature*, **324**, 641-646, 1986.
- Werner EA, Deluca HF. Retinoic acid is detected at relatively high levels in the CNS of adult rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **282**, E672-E678, 2002.
- White NM, McDonald RJ. Multiple parallel memory systems in the brain of the rat. *Neurobiol Learn Mem*, **77**, 125-184, 2000.
- Wiers RW, van Woerden N, Smulders FT, de Jong PJ. Implicit and explicit alcohol-related cognitions in heavy and light drinkers. *J Abnorm Psychol*, **111**, 648-658, 2002.

- Williams GR, Franklyn JA, Neuberger JM, Sheppard MC. Thyroid hormone receptor expression in the "sick euthyroid" syndrome. *Lancet*, **2**, 1477-1481, 1989.
- Williams GR. Cloning and characterization of two novel thyroid hormone receptor beta isoforms. *Mol Cell Biol*, **20**, 8329-42, 2000.
- Willson TM, Moore JT. Genomics versus orphan nuclear receptors--a half-time report. *Mol Endocrinol*, **16**, 1135-1144, 2002.
- Wion D, Houlgatte R, Barbot N, Barrand P, Dicou E, Brachet P. Retinoic acid increases the expression of NGF gene in mouse L cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **149**, 510-514, 1987.
- Wondisford FE, Farr EA, Radovick S, Steinfelder HJ, Moates JM, McClaskey JH, Weintraub BD. Thyroid hormone inhibition of human thyrotropin beta-subunit gene expression is mediated by a cis-acting element located in the first exon. *J Biol Chem*, **264**, 14601-14604, 1989.
- Wu Q, Li Y, Liu R, Agadir A, Lee MO, Liu Y, Zhang X. Modulation of retinoic acid sensitivity in lung cancer cells through dynamic balance of orphan receptors nur77 and COUP-TF and their heterodimerization. *EMBO J*, **16**, 1656-1669, 1997.
- Wuarin L, Chang B, Wada R, Sidell N. Retinoic acid up-regulates nuclear retinoic acid receptor-alpha expression in human neuroblastoma cells. *Int J Cancer*, **56**, 840-845, 1994.
- Yamagata T, Momoi T, Kumagai H, Yanagisawa M, Momoi M. Distribution of retinoic acid receptor  $\beta$  in rat brain: up-regulation by retinoic acid. *Biomed Res*, **14**, 183-190, 1993.
- Yamamoto Y, Zolfaghari R, Ross AC. 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**, 2119-2127, 2000.
- Yang N, Schule R, Mangelsdorf DJ, Evans RM. Characterization of DNA binding and retinoic acid binding properties of retinoic acid receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, **88**, 3559-3563, 1991.
- Yang ZN, Davis GJ, Hurley TD, Stone CL, Li TK, Bosron WF. Catalytic efficiency of human alcohol dehydrogenases for retinol oxidation and retinal reduction. *Alcohol Clin Exp Res*, **18**, 587-591, 1994.
- Yen PM, Sugawara A, Chin WW. Triiodothyronine (T3) differentially affects T3-receptor/retinoic acid and T3-receptor/retinoid X receptor heterodimer binding to DNA. *J Biol Chem*, **267**, 23448-23452, 1992.
- Yen PM, Chin WW. Molecular mechanisms of dominant negative activity by nuclear hormone receptors. *Mol Endocrinol*, **8**, 1450-1454, 1994.
- Yen PM. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev*, **81**, 1097-1142, 2001.
- Yiannakouris N, Valcana T. Effects of hypothyroidism on RNA synthesis in the adult rat brain. *Neurochem Res*, **19**, 1325-1332, 1994.
- Yuan PQ, Yang H. Localization of thyroid hormone receptor beta2 in the ventral medullary neurons that synthesize thyrotropin-releasing hormone. *Brain Res*, **868**, 22-30, 2000.
- Zago LB, Dupraz H, Sarchi MI, Rio ME. The molar ratio of retinol-binding protein to transthyretin in the assessment of vitamin A status in adults. Proposal of a cut-off point. *Clin Chem Lab Med*, **40**, 1301-1307, 2002.

- Zetterström RH, Simon A, Giacobini MM, Eriksson U, Olson L. Localization of cellular retinoid-binding proteins suggests specific roles for retinoids in the adult central nervous system. *Neuroscience*, **62**, 899-918, 1994.
- Zetterström RH, Lindqvist E, Mata de Urquiza A, Tomac A, Eriksson U, Perlmann T, Olson L. 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, 1999.
- Zhang QY, Dunbar D, Kaminsky L. Human cytochrome P-450 metabolism of retinals to retinoic acids. *Drug Metab Dispos*, **28**, 292-297, 2000.
- Zhao D, McCaffery P, Ivins KJ, Neve RL, Hogan P, Chin WW, Drager UC. Molecular identification of a major retinoic-acid-synthesizing enzyme, a retinaldehyde-specific dehydrogenase. *Eur J Biochem*, **240**, 15-22, 1996.
- Zheng W, Blaner WS, Zhao Q. Inhibition by lead of production and secretion of transthyretin in the choroid plexus: its relation to thyroxine transport at blood-CSF barrier. *Toxicol Appl Pharmacol*, **155**, 24-31, 1999.
- Zolfaghari R, Ross AC. Lecithin:retinol acyltransferase from mouse and rat liver. CDNA cloning and liver-specific regulation by dietary vitamin a and retinoic acid. *J Lipid Res*, **41**, 2024-2034, 2000.
- Zou L, Hagen SG, Strait KA, Oppenheimer JH. Identification of thyroid hormone response elements in rodent Pcp-2, a developmentally regulated gene of cerebellar Purkinje cells. *J Biol Chem*, **269**, 13346-13352, 1994.

## RESUME

Un ensemble de données cohérentes plaide en faveur de l'intervention de l'alcool dans les métabolismes de l'acide rétinoïque (AR) et de la triiodothyronine (T3). Les conséquences potentielles de ce phénomène sont importantes compte tenu des rôles joués par l'AR et la T3 dans les processus neurobiologiques et cognitifs. Par ailleurs, divers arguments expérimentaux suggèrent qu'une hypoexpression des voies de signalisation cellulaire de l'AR et de la T3 puisse être impliquée dans l'apparition de certaines altérations neurobiologiques liées au vieillissement.

Le premier objectif de notre recherche était de mieux comprendre l'influence d'une consommation chronique d'alcool sur l'action cellulaire de l'AR et de la T3, chez des souris C57Bl/6 adultes et âgées, et ses conséquences neurobiologiques, en mesurant (i) l'expression des récepteurs nucléaires de l'AR (RAR, RXR) et de la T3 (TR) et de certains de leurs gènes cibles impliqués dans la plasticité synaptique (la transglutaminase tissulaire, la neuromoduline et la neurogranine), (ii) les performances mnésiques des animaux.

Les principaux résultats obtenus montrent que :

- > L'administration d'un antagoniste de synthèse des RAR à des animaux adultes alcoolisés supprime la surexpression des RAR et RXR dans le cerveau et améliore leurs capacités mnésiques.
- > Une consommation modérée d'alcool, chez l'animal âgé, est susceptible de réinduire les voies de signalisation de l'AR et de la T3, hypoactivées avec l'âge, et d'atténuer certains déficits mnésiques liés au vieillissement.

Ainsi dans les conditions d'alcoolisation chronique mises en œuvre nos résultats montrent que les répercussions neurobiologiques et cognitives induites par la consommation d'alcool dépendent de l'âge du sujet et produisent des effets «bi-directionnels» (i.e., une perturbation ou une facilitation).

Par la suite, nous avons cherché à éprouver chez l'homme nos hypothèses construites à partir de données obtenues chez l'animal.

- > Nous avons mis en évidence une corrélation entre la consommation d'alcool et l'expression des ARNm des TR $\alpha$  et RAR $\alpha$  dans les cellules mononucléées du sang de sujets âgés, sans variation des paramètres sériques des statuts vitamérique A et thyroïdien. Ces résultats suggèrent (i) une augmentation de la biodisponibilité intracellulaire de l'AR et de la T3 induite par l'alcool, (ii) que l'expression des récepteurs nucléaires de l'AR et de la T3 dans les cellules mononucléées pourraient constituer un marqueur de l'impact de l'alcool sur les systèmes biologiques.

Ce travail apporte de nouvelles données sur les répercussions d'une consommation d'alcool sur l'action cellulaire de l'AR et de la T3, et souligne la nécessité de prendre en compte non seulement les doses d'alcool ingérées mais aussi l'âge des sujets.

## MOTS CLES

Acide rétinoïque (AR) - Triiodothyronine (T3) – Récepteurs nucléaires - Alcoolisation chronique - Cerveau - Souris C57Bl/6 - Homme - Neuromoduline (GAP-43) - Neurogranine (RC3) - Vieillesse