

N° d'ordre : 2836

# THESE

PRESENTEE A

## L'UNIVERSITE BORDEAUX I

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DU VIVANT, GEOSCIENCES,  
SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT

PAR

**CATHERINE FEART**

POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR**

SPECIALITE : SCIENCES DES ALIMENTS ET NUTRITION

\*\*\*\*\*

**ACTION CELLULAIRE DE L'ACIDE RETINOIQUE  
ET DE LA TRIIODOTHYRONINE AU COURS DU VIEILLISSEMENT  
- ETUDES EXPERIMENTALES ET BIOMEDICALES -**

\*\*\*\*\*

Soutenue le : 02 Juillet 2004

*Après avis de :*

Véronique AZAIS-BRAESCO  
Luc PENICAUD

Directeur de Recherche, INRA - Theix  
Directeur de Recherche, CNRS - Toulouse

*Devant la commission d'examen formée de :*

Robert JAFFARD (PR. – Université Bordeaux 1)  
Véronique AZAIS-BRAESCO (DR. INRA – Theix)  
Luc PENICAUD (DR. CNRS – Toulouse)  
Paul HIGUERET (PR. – Université Bordeaux 1)  
Pascale BARBERGER-GATEAU (MCU-PH INSERM – Université Bordeaux 2)  
Véronique PALLET (PR. – Université Bordeaux 1)

**Président  
Rapporteurs**

**Examineurs**

- 2004 -



A mes grands-parents,

A mes parents,

A ma sœur,

A toute ma famille,

A Sébastien.

Depuis le premier jour, j'ai toujours pu compter sur vous. Merci d'avoir cru en moi.



## AVANT PROPOS

A l'heure où s'achève ce rapport de thèse, je tiens en premier lieu à exprimer toute ma reconnaissance au Pr. *Paul Higuieret*, Directeur de l'Unité de Nutrition et Signalisation Cellulaire, pour m'avoir ouvert les portes de son laboratoire et accueillie au sein de son équipe de recherche, ainsi que pour l'intérêt dont il a fait preuve dans la réalisation de ce travail tout au long de ces 4 années de thèse.

Je remercie très respectueusement le Pr. *Robert Jaffard* qui m'a fait l'honneur de présider le jury de cette thèse.

Je tiens à remercier le DR *Luc Pénicaud* pour s'être prêté au rôle de rapporteur. Les observations constructives qu'il m'a formulées témoignent de l'attention qu'il a accordé à ce manuscrit.

Je tiens à remercier plus particulièrement le DR *Véronique Braesco* pour avoir accepté d'examiner et de juger ce travail. Ses remarques pertinentes ont permis de gratifier ce travail. Nos chemins se sont parfois croisés depuis mon DEA, réalisé sous sa direction, dans l'équipe "Vitamines". Mon engouement pour la recherche n'aurait pas été le même sans cette expérience si enrichissante. Mes remerciements vont également à tous les membres de cette équipe.

Le Dr. *Pascale Barberger-Gateau* a accepté de faire partie de la commission d'examen chargée de juger ce travail. Je lui en suis très reconnaissante. L'avis d'une spécialiste de l'épidémiologie a été d'un grand intérêt analytique. Aujourd'hui, je partage avec enthousiasme et dynamisme sa passion de l'épidémiologie et garde l'espoir d'une collaboration prochaine.

*Véronique (Pr. Pallet)*, vous qui avez encadré ce travail, je tenais à vous exprimer toute ma reconnaissance pour m'avoir confié un défi passionnant et accompagné depuis mon DEA jusqu'au jour de la soutenance. Merci pour la confiance que vous m'avez témoignée et qui m'a permis de faire la preuve de mon autonomie. Je me rends compte que le choix de mots "justes et précis" se justifie pleinement aujourd'hui encore. J'en prends bonne note pour mes activités futures.

J'exprime toute ma reconnaissance au Dr. *Valérie Enderlin* pour son investissement dans ce projet. Merci également d'avoir guidé mes premiers pas dans l'enseignement; j'en garderai un très bon souvenir.

Je tiens également à remercier le Dr. *Denise Higuieret* pour son accueil dans le service de Biochimie de l'hôpital Pellegrin, sa disponibilité et ses conseils lors de notre collaboration.

Le Dr. *Luc Letenneur* et le Pr. *Antoine Tabarin* ont participé activement au recrutement des volontaires âgés et hypothyroïdiens. Je tiens à les remercier de leur investissement dans cette tâche.

Cette thèse n'aurait pas pu aboutir sans le soutien actif et la bonne humeur de l'ensemble des membres de l'Unité de Nutrition. Je remercierai chaleureusement *Pierrette, Catherine (S), Anabelle, Serge, Claude, Carine, Marianne, Catherine (B), Frédérique, Julie, Benjamin, Laurent (C), Isabelle (G) et Liliane.*

Et plus particulièrement, je souhaite beaucoup de réussite à *Barbara* (dont les effets Delage (lire "de l'âge") vont bien au-delà de ceux décrits dans ce manuscrit) et *Céline (B)* (à qui je donne rendez-vous en décembre 2005, et pas plus tard...).

Un merci plus général et non moins chaleureux à d'autres membres (anciens ou présents) de l'unité ou d'ailleurs qui m'ont fait l'amitié de s'intéresser à mon sort : *Ludovic, Khalid, Isabelle (M), Sandrine (D), Sandrine (O), Sophie (L), Margarita, Aurélien, Pierre, Noredine, Frédéric, Maria, Kiki.*

Une mention spéciale pour des amis qui ont été trop souvent loin de moi, mais qui m'ont soutenu chacun à leur manière depuis le premier jour. Je pense notamment à *Catherine (R-B)*; qui est vraiment toujours trop loin...), *Patrick* (dont la venue à Bordeaux est une chance pour la recherche bordelaise...) et *Madame, Laurent (L), Céline (R), Aline, Manuela, Sophie (B) et Aude.* S'ajoute à cette liste une amie précieuse à qui je dois beaucoup, surtout pour la dernière ligne droite, *K. S. N.*

Mes plus vifs et sincères remerciements vont tout naturellement à mes *parents.* La tendresse, l'affection, ainsi que la confiance, le soutien et les encouragements que vous n'avez jamais cessé de me témoigner tout au long de ma vie et de mes études ont été des éléments clés de cette réussite. Ce manuscrit est la récompense de votre dévouement.

Je tiens également à exprimer toute ma tendresse à ma "*grande sœur*" sans qui je n'aurais jamais eu le goût pour les études. Elle est un modèle que je me suis attachée à suivre fidèlement.

Je n'oublierai pas de remercier pour leur soutien l'ensemble des membres de ma *famille* et de ma "*belle-famille*" ; avec une mention particulière pour l'oreille attentive et si compréhensive de ma colocataire bordelaise.

Mes avant-dernières pensées iront à mes *grands-parents* pour la tendresse et l'affection dont ils m'ont entourée. Ils auraient sans doute été les deux personnes les plus fières de tenir cet ouvrage entre leurs mains. Sachez que sans vous, "je est une autre".

Enfin, mes derniers et plus tendres mots seront pour *Sébastien.* Tout au long de mon exil, nous avons tenu la distance, fait de nombreux sacrifices, et partagé tous les moments; des plus difficiles aux plus heureux. Aujourd'hui, je ne me souviens que d'un mur immense, mais nous étions ensemble... et ensemble, nous l'avons franchi. Merci de ta patience, que je mets à rude épreuve une année encore, de ta tolérance, ton réconfort, ton soutien, ta gentillesse et ton amour... Sans toi, jamais je n'aurais pu tenir. MERCI du fond du cœur.







## **SOMMAIRE**

*Sommaire*

*Liste des figures*

*Liste des tableaux*

*Liste des abréviations*

*Résumé*

<b><u>INTRODUCTION</u></b>	<b>1</b>
<b><u>CHAPITRE I : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES</u></b>	<b>4</b>
<i>I. GENERALITES SUR L'ACIDE RETINOÏQUE ET LA TRIIODOTHYRONINE</i>	<i>4</i>
<b>I.1. L'acide rétinoïque : le dérivé actif de la vitamine A</b>	<b>4</b>
I.1.1. Définition et propriétés physico-chimiques des rétinoïdes	4
I.1.2. Sources principales de vitamine A et recommandations	5
I.1.3. Métabolisme général de la vitamine A	6
I.1.4. Synthèse de l'acide rétinoïque	8
Homéostasie de l'AR	9
I.1.5. Métabolisme cérébral de la vitamine A	10
I.1.5.1. Présence des protéines de liaison des rétinoïdes	10
I.1.5.2. Synthèse de l'acide rétinoïque	11
I.1.6. Catabolisme de l'acide rétinoïque	12
I.1.7. Rôles génériques de la vitamine A et de l'acide rétinoïque	12
<b>I.2. La triiodothyronine : la forme active des hormones thyroïdiennes</b>	<b>14</b>
I.2.1. Synthèse des hormones thyroïdiennes et mise en réserve	14
I.2.2. Sécrétion des hormones thyroïdiennes et synthèse de la triiodothyronine	15
Captation tissulaire et transformation de T4 en T3	17
I.2.3. Régulation de la synthèse des hormones thyroïdiennes	17
I.2.4. Catabolisme des hormones thyroïdiennes	19
I.2.5. Métabolisme cérébral des hormones thyroïdiennes	19
I.2.5.1. Transport du sang vers le cerveau	19
I.2.5.2. Synthèse de la triiodothyronine	19
I.2.6. Rôles génériques des hormones thyroïdiennes	20
<i>II. MODE D'ACTION NUCLEAIRE DE L'ACIDE RETINOÏQUE ET DE LA TRIIODOTHYRONINE</i>	<i>22</i>
<b>II.1. La superfamille des récepteurs nucléaires</b>	<b>22</b>
II.1.2. Structure générale	24
II.1.3. Mode d'action	26
II.1.3.1. Les éléments de réponse	26
II.1.3.2. Rôle des cofacteurs de transcription	26
<b>II.2. Les récepteurs de l'acide rétinoïque</b>	<b>29</b>

II.2.1. Les différents types de récepteurs	29
II.2.2. Distribution tissulaire	29
<b>II.3. Les récepteurs de la triiodothyronine</b>	<b>31</b>
II.3.1. Les différents types de récepteurs	31
II.3.2. Distribution tissulaire	31
<b>II.4. Régulation des récepteurs nucléaires</b>	<b>32</b>
II.4.1. Auto-régulation	32
II.4.2. Hétérodimérisation et hétérorégulation	33
<b>II.5. Gènes régulés par l'acide rétinoïque et la triiodothyronine</b>	<b>34</b>
II.5.1. Implication des rétinoïdes et des hormones thyroïdiennes dans le cerveau adulte	34
II.5.2. Gènes impliqués dans la plasticité synaptique	37
II.5.2.1. Données générales sur la plasticité synaptique	37
II.5.2.2. La transglutaminase tissulaire	39
II.5.2.3. La neuromoduline	40
II.5.2.4. La neurogranine	40
 <i>III. INTERACTIONS DES VOIES DE SIGNALISATION DE L'ACIDE RETINOÏQUE ET DE LA TRIIODOTHYRONINE</i>	 42
<b>III.1. Interactions métaboliques</b>	<b>42</b>
<b>III.2. Interactions nucléaires</b>	<b>43</b>
 <i>IV. LE VIEILLISSEMENT</i>	 44
<b>IV.1. Données générales sur les différents processus liés au vieillissement</b>	<b>44</b>
IV.1.1. Définition	44
IV.1.2. Le vieillissement cérébral	45
<b>IV.2. Conséquences sur les voies de signalisation de l'acide rétinoïque et de la triiodothyronine</b>	<b>46</b>
IV.2.1. Au niveau métabolique	46
IV.2.2. Au niveau nucléaire	47
IV.2.3. Au niveau fonctionnel	48
<b>IV.3. Le modèle de la carence en vitamine A</b>	<b>49</b>
 <b><u>OBJECTIFS DE TRAVAIL</u></b>	 <b>51</b>
 <b><u>CHAPITRE II : ETUDES EXPERIMENTALES</u></b>	 <b>54</b>
 <i>I. ACTION CELLULAIRE DE L'ACIDE RETINOÏQUE ET DE LA TRIIODOTHYRONINE DANS LE CERVEAU DE RATS CARENCES EN VITAMINE A</i>	 54
<b>I.1. Méthodologie utilisée</b>	<b>55</b>
<b>I.2. Principaux résultats et discussion partielle</b>	<b>56</b>

PUBLICATION 1

*TRIODOOTHYRONINE ADMINISTRATION REVERSES VITAMIN A DEFICIENCY-RELATED HYPO-EXPRESSION OF RETINOIC ACID AND TRIODOOTHYRONINE NUCLEAR RECEPTORS AND OF NEUROGRANIN IN RAT BRAIN*

**I.3. Conclusion** 57

*II. ACTION CELLULAIRE DE L'ACIDE RETINOÏQUE ET DE LA TRIODOOTHYRONINE CHEZ DES RATS AGES* 58

**II.1. Effets comparés de l'administration d'acide rétinoïque ou de triiodothyronine sur l'activité de leurs voies de signalisation dans le cerveau de rats âgés.** 59

II.1.1. Méthodologie utilisée 59

II.1.2. Principaux résultats et discussion partielle 60

PUBLICATION 2

*DIFFERENTIAL EFFECT OF RETINOIC ACID AND TRIODOOTHYRONINE ON THE AGE-RELATED HYPO-EXPRESSION OF NEUROGRANIN IN RAT*

II.1.3. Conclusion 61

**II.2. Effets comparés de l'administration d'acide rétinoïque ou de triiodothyronine sur l'activité de leurs voies d'action dans le foie de rats âgés.** 62

II.2.1. Méthodologie utilisée 62

II.2.2. Principaux résultats 62

II.2.3. Discussion partielle 64

II.2.4. Conclusion 65

**CHAPITRE III : ETUDES BIOMEDICALES** 66

*I. EXPRESSION DES RECEPTEURS NUCLEAIRES DE L'ACIDE RETINOÏQUE ET DE LA TRIODOOTHYRONINE DANS LES CELLULES MONONUCLEEES DU SANG CHEZ LE SUJET AGE* 68

**I.1. Méthodologie utilisée** 70

**I.2. Principaux résultats et discussion partielle** 70

PUBLICATION 3

*AGING AFFECTS THE RETINOIC ACID AND THE TRIODOOTHYRONINE NUCLEAR RECEPTOR mRNA EXPRESSION IN HUMAN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS*

**I.3. Conclusion** 72

<i>II. EXPRESSION DES RECEPTEURS NUCLEAIRES DE LA TRIIODOTHYRONINE ET DE L'ACIDE RETINOÏQUE DANS LES CELLULES MONONUCLEES DU SANG CHEZ DES SUJETS HYPOTHYROÏDIENS</i>	73
---	----

<b>II.1. Méthodologie utilisée</b>	75
------------------------------------	----

<b>II.2. Principaux résultats et discussion partielle</b>	75
---	----

PUBLICATION 4

*DECREASED EXPRESSION OF RETINOID NUCLEAR RECEPTORS (RAR $\alpha$  AND RAR $\gamma$ ) mRNA DETERMINED BY REAL-TIME QUANTITATIVE RT-PCR IN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS OF HYPOTHYROID PATIENTS*

<b>II.3. Conclusion</b>	77
-------------------------	----

<b><u>CHAPITRE IV : DISCUSSION GENERALE</u></b>	78
---	----

<i>I. ETUDES EXPERIMENTALES</i>	78
---------------------------------	----

<b>I.1. Rappel des principaux résultats</b>	78
---	----

<b>I.2. Le vieillissement et la carence vitaminique A sont deux situations qui induisent une baisse simultanée de l'activité des voies d'action de l'acide rétinoïque et de la triiodothyronine</b>	80
---	----

<b>I.3. Le statut thyroïdien influence l'efficacité d'un traitement par l'acide rétinoïque</b>	82
--	----

<b>I.4. L'hypoactivité des voies d'action de l'acide rétinoïque et de la triiodothyronine contribue à l'apparition de certains troubles neurobiologiques liés au vieillissement</b>	84
---	----

<b>I.5. Quels processus adaptatifs se mettent en place au cours du vieillissement ?</b>	87
---	----

<b>I.6. Conclusion partielle</b>	90
----------------------------------	----

<i>II.2. ETUDES BIOMEDICALES</i>	91
----------------------------------	----

<b>Comparaison des effets de l'âge et de l'hypothyroïdie chez l'homme</b>	92
---	----

<b><u>CONCLUSION</u></b>	95
--------------------------	----

<b><u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u></b>	98
---	----

## **LISTE DES FIGURES**

Figure 1 : Formules chimiques de quelques rétinoïdes	5
Figure 2 : Métabolisme général de la vitamine A	7
Figure 3 : Voies de biosynthèse de l'acide rétinoïque	9
Figure 4 : Structure des hormones thyroïdiennes et de leurs dérivés	14
Figure 5 : Métabolisme général des hormones thyroïdiennes	16
Figure 6 : Le rétro-contrôle de l'axe hypothalamo-hypophyso-thyroïdien	18
Figure 7 : Architecture des récepteurs nucléaires	25
Figure 8 : Mécanisme d'action des récepteurs nucléaires (RAR et RXR) en présence de cofacteurs de transcription	28
Figure 9 : Variation de l'expression des récepteurs de l'AR et de la T3 et de certains gènes cibles dans le cerveau de rats âgés ou carencés en vitamine A	80
Figure 10 : Schéma récapitulatif des différents niveaux d'intervention des rétinoïdes et des hormones thyroïdiennes au niveau d'une synapse	85
Figure 11 : Schéma hypothétique de l'action de l'AR au cours des processus adaptatifs liés au vieillissement ou à une carence en vitamine A	89
Figure 12 : Variation de l'expression de différents sous-types de récepteurs nucléaires de l'AR et de la T3 dans les PBMC de sujets âgés et hypothyroïdiens	91

## **LISTE DES TABLEAUX**

Tableau I : Esquisse des symptômes observés en cas de déficience ou d'excès en vitamine A	13
Tableau II : Esquisse des symptômes observés en cas de déficience ou d'excès en hormones thyroïdiennes	20
Tableau III : Quelques membres de la superfamille des récepteurs nucléaires des hormones	23
Tableau IV : Exemples de gènes régulés par l'acide rétinoïque dans le cerveau	35
Tableau V : Exemples de gènes régulés par la triiodothyronine dans le cerveau	38
Tableau VI : Effets de l'administration d'AR sur les capacités de liaison des RAR et TR et sur l'expression de RAR $\beta$ et TR $\alpha/\beta$ dans le foie de rats âgés	63
Tableau VII : Effets de l'administration d'AR ou de T3 sur les activités enzymatiques de la tTG et de la ME dans le foie de rats âgés	64

## LISTE DES ABREVIATIONS

ADH	alcool déshydrogénase
ADN	acide désoxyribonucléique
ALDH	aldéhyde déshydrogénase
AMPA	$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxalolepropionate
AR	acide rétinoïque
ARAT	"acyl-CoA : retinol acyl transferase"
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messenger
BDNF	"brain-derived neurotrophic factor"
CaM	calmoduline
CaMKII	protéine kinase $Ca^{2+}$ /calmoduline dépendante de type II
CaN	calcineurine
CE	cerveau entier
Cmax	capacité maximale de liaison
CRABP	"cellular retinoic acid binding protein" : protéine cellulaire liant l'acide rétinoïque
CREB	"cAMP response element binding"
CRBP	"cellular retinol binding protein" : protéine cellulaire liant le rétinol
CTBP	"cytosolic thyroid hormone-binding protein"
Cx	cortex cérébral
DR	"direct repeat" : motif en répétition directe
ER	équivalent rétinol
FT3	"free triiodothyronine" : triiodothyronine libre
FT4	"free thyroxine" : thyroxine libre
GAP43	"growth associated protein 43" : neuromoduline
GAPDH	glycéraldéhyde 3 phosphate déshydrogénase
GR	récepteur nucléaire des glucocorticoïdes
HDL	"high density lipoprotein"
Hpc	hippocampe
HRE	"hormone response element"
HT	hormones thyroïdiennes

LDL	"low density lipoprotein"
LRAT	lécithine : rétinol acyl transférase
ME	enzyme malique
MDR	medium chain dehydrogenase/reductase
NAD	nicotinamide adénine dinucléotide
NADP	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NGF	"nerve growth factor"
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
NT-3	neurotrophine-3
PBMC	"peripheral blood mononuclear cells"
PCR	"polymerase chain reaction" : amplification enzymatique en chaîne
PKC	protéine kinase C
PLT	potentialisation à long terme
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"
RC3	neurogranine
RDH/RoDH	rétinol déshydrogénases microsomales
REH	rétinyl ester hydrolase
ROH	rétinol
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
St	striatum
T3	3,5,3'-triiodothyronine
T4	3,5,3',5'-tétraiodothyronine
TBG	"thyroxin binding globulin"
TC	cholestérol total
TPO	thyropéroxydase
TR	Récepteur nucléaire de la triiodothyronine



TRE	élément de réponse à la triiodothyronine
TRH	thyroolibérine
TSH	thyrotropine
TTG	triglycérides totaux
tTG	transglutaminase tissulaire
TTR	transthyrétine
VLDL	"very low density lipoprotein"



## **- RESUME -**

Divers arguments expérimentaux permettent de faire l'hypothèse que des modifications dans le statut nutritionnel et hormonal peuvent être impliquées dans l'apparition des altérations neurobiologiques liées au vieillissement. A titre d'exemple, des études menées chez l'animal âgé ou carencé en vitamine A ont fait la démonstration d'une relation entre le niveau d'activité de la voie d'action des rétinoïdes et des performances cognitives.

L'objectif de notre recherche était d'étudier les conséquences du vieillissement sur l'activité des voies de signalisation de l'acide rétinoïque (AR) et de la triiodothyronine (T3) et de déterminer jusqu'à quel stade des processus adaptatifs et dans quelles conditions il était possible de maintenir des capacités fonctionnelles.

Dans un premier temps, nous avons éprouvé nos hypothèses chez l'animal. Nous avons comparé, dans le cerveau de rats, les effets de l'âge et d'une carence en vitamine A sur les activités des voies de signalisation de l'AR et de la T3 et sur certains de leurs gènes cibles impliqués dans les phénomènes de plasticité synaptique (la transglutaminase tissulaire, la neuromoduline et la neurogranine). Nos résultats montrent que le vieillissement et la carence vitaminique A entraînent une diminution de l'expression des récepteurs nucléaires de l'AR et de la T3 et de leurs gènes cibles. L'administration d'AR ne permet de réactiver que sa propre voie de signalisation ; alors que l'administration de T3 est capable de restaurer l'expression de l'ensemble des gènes étudiés. Ces résultats mettent en évidence qu'un niveau optimum d'activité de la voie d'action de la T3 est indispensable au maintien de la fonctionnalité de l'AR.

Par la suite, nous avons éprouvé cette hypothèse chez l'Homme. Nous avons étudié les effets du vieillissement et de l'hypothyroïdie sur les voies d'action de l'AR et de la T3 dans les cellules mononucléées du sang chez l'Homme. Nos résultats apportent la preuve d'une hypoexpression des récepteurs nucléaires de l'AR et de la T3 liée à l'âge. Par ailleurs, l'hypothyroïdie s'accompagne d'altérations de la voie d'action de l'AR plus importantes que celles observées chez les sujets âgés. Ces données mettent en évidence pour la première fois chez l'Homme, une diminution de l'activité des voies de signalisation des rétinoïdes et des hormones thyroïdiennes.

Nos résultats plaident en faveur de l'hypothèse selon laquelle des dérégulations, même faibles, du niveau d'expression des récepteurs nucléaires pourraient contribuer aux processus de vieillissement de l'individu et aux pathologies qui lui sont associées.

## **- MOTS CLES -**

Acide rétinoïque (AR) - Triiodothyronine (T3) - Récepteurs nucléaires -  
Vieillessement - Carence vitaminique A - Hypothyroïdie - Animal - Homme - Cerveau -  
Cellules mononucléées du sang



# ***INTRODUCTION***



## ***INTRODUCTION***

La vitamine A et les hormones thyroïdiennes sont impliquées dans de nombreuses fonctions biologiques fondamentales telles que le développement, la vision, la différenciation cellulaire, l'immunité, l'homéostasie... (Sporn et al., 1994 ; revue dans Yen, 2001). Nos connaissances sur le mode d'action cellulaire de la vitamine A et des hormones thyroïdiennes ont été fondamentalement marquées par la découverte des récepteurs nucléaires de leurs métabolites actifs (respectivement, l'acide rétinoïque – AR - et la triiodothyronine - T3 -) (Sap et al., 1986 ; Petkovitch et al., 1987). Ces récepteurs nucléaires (RAR, RXR et TR) interviennent en tant que facteur de transcription dans le contrôle de l'expression génique. Ils appartiennent à la "superfamille" des récepteurs nucléaires (revue dans Zhang et Lazar, 2000 ; revue dans Marill et al., 2003) incluant également les récepteurs des hormones stéroïdes, de la vitamine D, des proliférateurs de péroxysomes... Tous les récepteurs de la superfamille ont une forte homologie de structure et participent à la régulation de l'expression des gènes par des mécanismes similaires en tant que facteur de transcription inductibles par leur ligand. Ils se lient sous forme de dimères au niveau du promoteur des gènes qu'ils régulent, par reconnaissance spécifique d'éléments de réponse caractéristiques du dimère impliqué (homo ou hétérodimère). La réponse (stimulation ou inhibition de la transcription) est dépendante des éléments de réponse mis en jeu, des complexes de facteurs de transcription en présence, de la biodisponibilité en ligand. Il apparaît ainsi qu'un changement du taux des différents 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.

Au-delà de leurs interactions au niveau nucléaire, la vitamine A et les hormones thyroïdiennes présentent une synergie d'action au niveau de leur métabolisme, de leur synthèse, de leur transport et des fonctions qu'elles assurent. Ainsi, les rôles essentiels que jouent l'acide rétinoïque et la triiodothyronine dans les processus du développement du système nerveux sont aujourd'hui bien documentés (revue dans Maden et Hind, 2003 ; Zoeller, 2003 ). Par contre, nos connaissances sur les fonctions que ces molécules exercent

dans le cerveau adulte sont plus récentes. En effet, le cerveau adulte aurait la capacité de synthétiser l'AR et posséderait le système de réponse aux rétinoïdes et aux hormones thyroïdiennes (revue dans Bauer et Whybrow, 2001 ; Thompson Haskell et al., 2002). Récemment, l'implication des rétinoïdes dans les phénomènes de 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 al., 1998 ; Cocco et al., 2002). Plus particulièrement, une étude réalisée dans le laboratoire en collaboration avec le laboratoire de Neurosciences Cognitives (UMR 5106 CNRS-Université Bordeaux 1) chez la souris âgée, a mis en évidence que le vieillissement cérébral s'accompagne d'une hypoexpression de la voie 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 restaurer l'activité de sa voie de signalisation à un niveau comparable à celle des animaux adultes et de supprimer totalement et sélectivement les déficits de mémoire observés (Enderlin et al., 1997a ; Etchamendy et al., 2001).

Ainsi il est possible d'envisager que certaines atteintes mnésiques survenant avec l'âge ne relèvent pas de lésions tissulaires irréversibles, mais appartiennent à une catégorie de modifications fonctionnelles générées par des modifications "hormonales" associées au vieillissement non pathologique et susceptibles d'être corrigées par un traitement efficace.

Le vieillissement est un phénomène complexe qui affecte l'organisme à tous les niveaux, des cellules aux organes. Généralement plus lente et plus tardive que le déclin des autres fonctions physiologiques, l'atteinte des fonctions cérébrales a des répercussions plus importantes (revue dans Lindeboom et Weinstein, 2004). Ainsi, l'identification des altérations neurobiologiques responsables des déficits mnésiques du sujet âgé constitue un objectif majeur des recherches actuelles sur le vieillissement.

Dans ce contexte, nos recherches sur l'action cellulaire des rétinoïdes et des hormones thyroïdiennes au cours du vieillissement cérébral visent à répondre à deux questions essentielles:

1. Quelles sont les conséquences neurobiologiques d'une hypoexpression de la voie d'action de l'acide rétinoïque et de la triiodothyronine?



2. L'hypoexpression d'une voie de signalisation s'accompagne de processus adaptatifs. Jusqu'à quel stade de ces processus est-il possible, par un traitement adapté, de maintenir des capacités fonctionnelles?

Le travail de thèse présenté ci-après apporte des éléments essentiels pour tenter de répondre à ces interrogations. D'une part, deux études expérimentales (**Chapitre II**) faisant appel à deux modèles animaux différents, que sont le rat carencé en vitamine A et le rat âgé, ont permis de souligner l'importance d'un niveau optimum d'activité de la voie d'action des hormones thyroïdiennes dans les réponses physiologiques assurées par l'acide rétinoïque. Ces études nous ont permis de définir un état adaptatif au cours duquel les mécanismes de régulation mis en place chez l'animal adulte sont altérés chez l'animal vieillissant.

D'autre part, nous avons cherché à éprouver nos hypothèses chez l'Homme, conformément aux orientations générales du laboratoire. Nos recherches visent donc à répondre à deux questions essentielles qui sont les suivantes :

1. Quelles sont les conséquences du vieillissement sur les voies d'action de l'acide rétinoïque et de la triiodothyronine chez l'Homme ?
2. Puisque des liens étroits existent entre ces deux voies de signalisation, quelles sont les conséquences d'une pathologie, telle que l'hypothyroïdie, sur l'activité de la voie d'action de l'acide rétinoïque ?

Deux études biomédicales (**Chapitre III**) ont fait suite à nos premiers travaux de recherche chez l'animal. Nous avons particulièrement étudié les niveaux d'activité des voies de signalisation de la vitamine A et des hormones thyroïdiennes dans les cellules mononucléées du sang de sujets humains. Ces études ont été réalisées chez des sujets adultes euthyroïdiens, âgés et chez des sujets souffrant d'hypothyroïdie. Dans l'ensemble, les résultats que nous avons obtenus nous ont permis de mettre en évidence, dans les situations physio- et pathologiques citées des déséquilibres de l'expression des récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque et de la triiodothyronine.



**CHAPITRE I**

***DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES***



## **CHAPITRE I : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES**

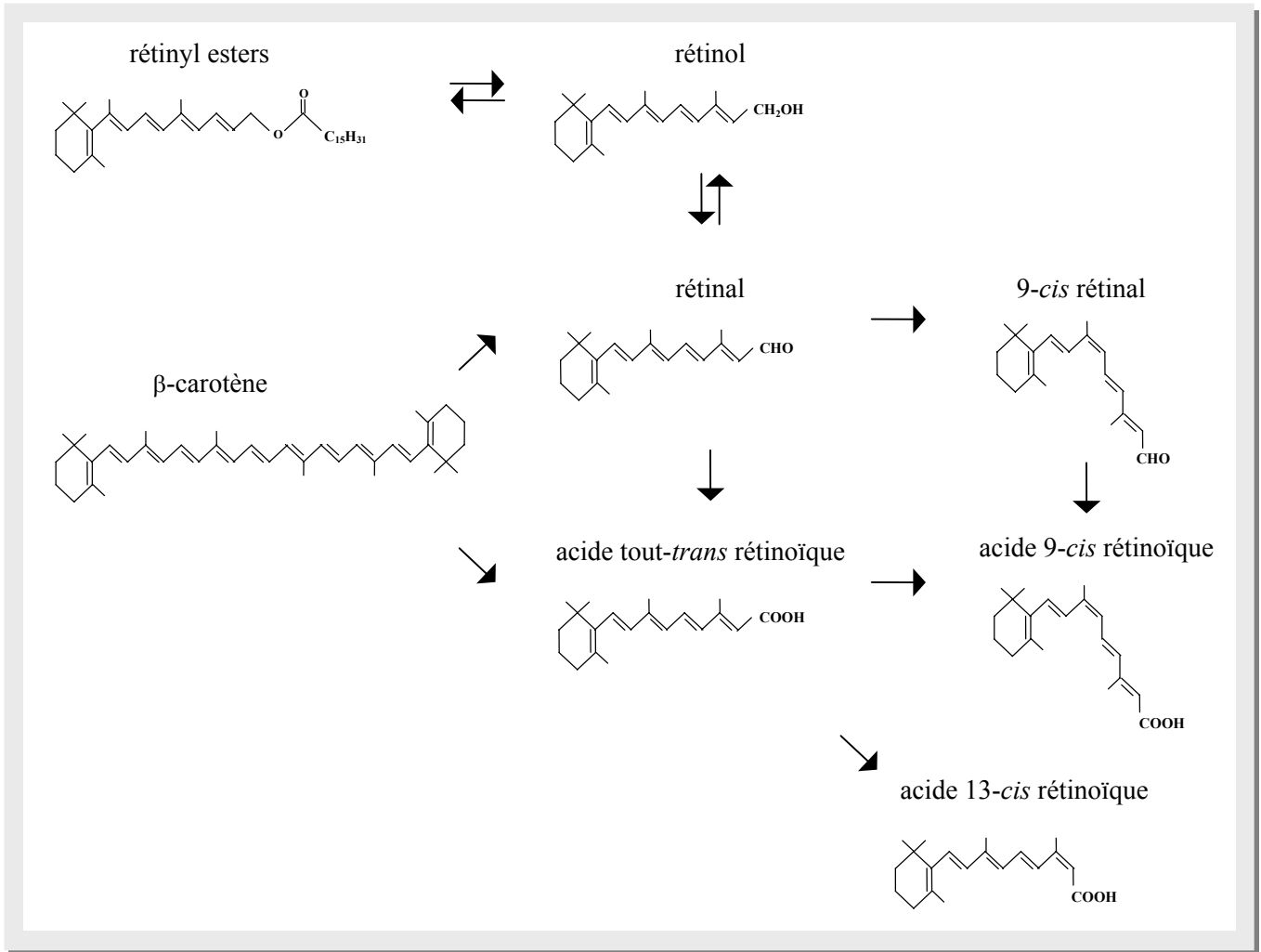
### **I. GENERALITES SUR L'ACIDE RETINOÏQUE ET LA TRIIODOTHYRONINE**

#### **I.1. L'ACIDE RETINOÏQUE : LE DERIVE ACTIF DE LA VITAMINE A**

##### **I.1.1. Définition et propriétés physico-chimiques des rétinoïdes**

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 sur la **figure 1**. Diverses définitions du terme "rétinoïdes" ont été proposées depuis la première définition de Sporn en 1976. Aujourd'hui, ce terme regroupe plus largement l'ensemble des dérivés naturels ou synthétiques apparentés au rétinol par la structure ou la fonction (Sporn et al., 1994).

Les structures isopréniques des rétinoïdes leur confèrent un caractère lipophile. Ces molécules hydrophobes ont nécessité le développement d'un système biologique dans lequel des protéines de liaison spécifiques des rétinoïdes 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, leur fournit une certaine spécificité d'activité. En solution, l'isomérisation (*cis/trans*) peut être induite par différents facteurs comme la lumière ou l'oxygène. Des précautions particulières doivent alors être prises lors de la manipulation et de l'analyse de ces composés (Aust, 2001).



**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*.

### I.1.2. Sources principales de vitamine A et recommandations

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 rétynyl esters) dans l'huile de foie de poisson (morue, flétan, thon...), le beurre, le lait, le fromage et les œufs. Les caroténoïdes rencontrés essentiellement dans les végétaux (carottes, épinards, choux) et dans les pigments de certains fruits (oranges, abricots) sont des sources de provitamines A, converties au niveau de l'intestin en vitamine A. Parmi les principaux caroténoïdes il semblerait que le  $\beta$ -carotène soit le plus efficace des précurseurs, pourvu d'activités biologiques étendues (revue dans Bendich, 2004).

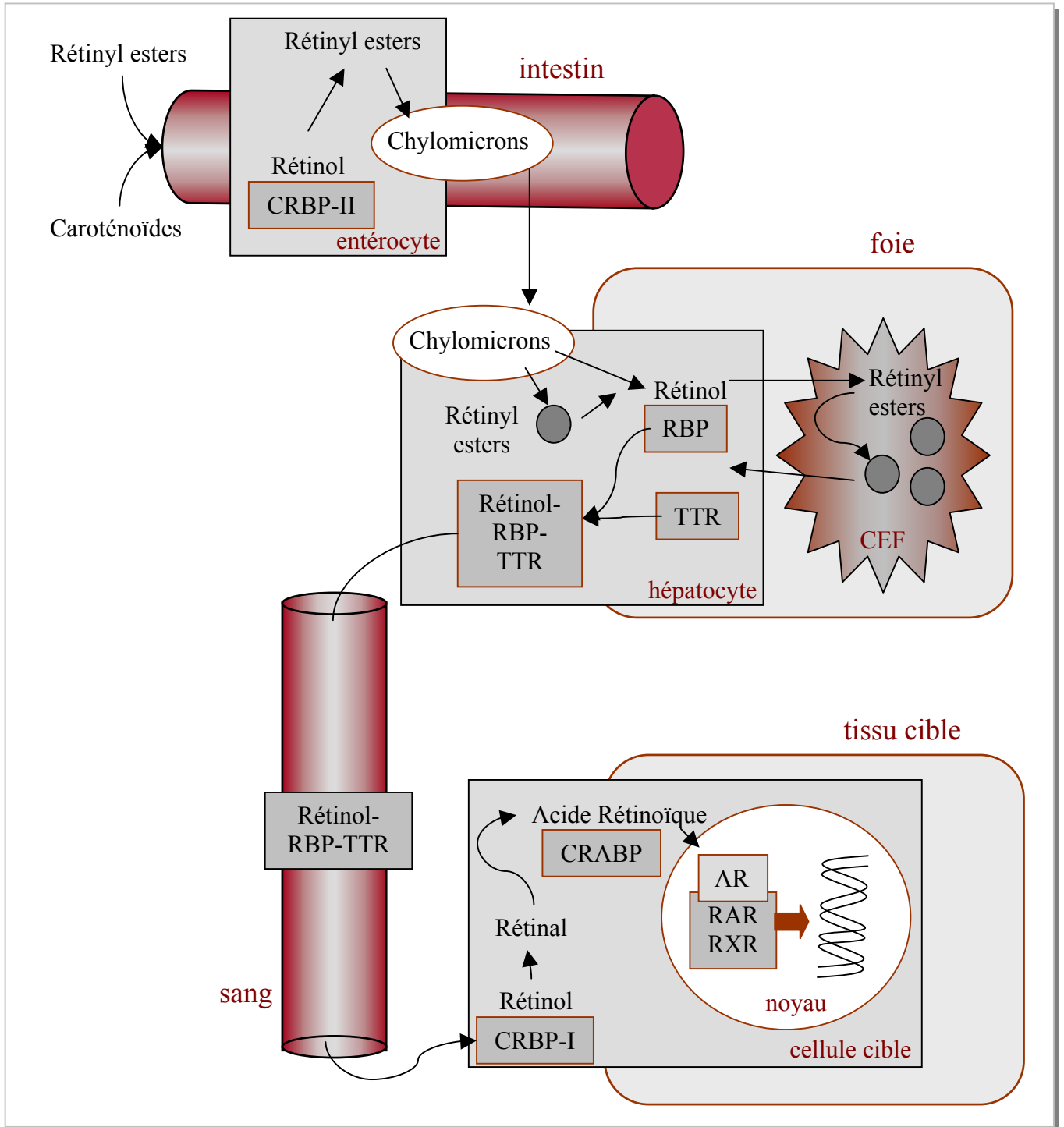
Les besoins de la consommation en vitamine A sont donnés en équivalents rétinol (ER). En France selon les tranches d'âge, les ANC (Apports Nutritionnels Conseillés) sont compris entre 350 et 950 ER par jour dont au moins 50% devraient être apportés sous forme de  $\beta$ -carotène. Ces recommandations encouragent la consommation de plus de 5 fruits et légumes par jour (Martin, 2001 ; revue dans Cooper, 2004).

Les états de carence franche en vitamine A se rencontrent dans les pays en développement et restent rares dans les pays industrialisés. Ces derniers sont plutôt le siège d'états précairentiels ou subcairentiels, qui restent souvent sans expression clinique révélatrice, ce qui les rend difficiles à diagnostiquer. En France, les populations à risques concernent pour la majeure partie les personnes âgées de plus de 65 ans.

### **I.1.3. Métabolisme général de la vitamine A**

La conversion des caroténoïdes pro-vitaminiques A en rétinol a lieu essentiellement dans la muqueuse intestinale. Le rétinol nouvellement formé, ainsi que celui apporté par l'alimentation constitue le rétinoïde le plus abondant dans le sang (95% du rétinol sont liés aux protéines vectrices permettant leur transport). Il est ensuite estérifié dans la muqueuse intestinale et transporté vers le foie qui assure la mise en réserve de la vitamine A sous forme de rétinyl esters. En fonction des besoins de l'organisme, les rétinyl esters seront alors hydrolysés en rétinol libre qui sera sécrété dans le plasma, véhiculé par un complexe protéique composé de la rétinol binding protéine (RBP) et de la préalbumine ou transthyrétine (TTR). Le flux de rétinol libéré par le foie est très finement régulé de manière à maintenir une concentration constante de rétinol dans le plasma (2  $\mu\text{mol/L}$ ). Au-delà des besoins immédiats, la vitamine A alimentaire sert à constituer des réserves hépatiques qui seront utilisées par la suite au cours des périodes d'apports insuffisants. Les principaux métabolites actifs de la vitamine A sont le rétinol, molécule essentielle pour la vision, et l'acide rétinoïque (AR) qui est un puissant régulateur de l'expression du génome.

Le métabolisme de la vitamine A peut ainsi se diviser en trois grandes étapes : l'absorption intestinale, le métabolisme hépatique (mise en réserve) et la mobilisation de la vitamine A et son transport jusqu'aux tissus cibles. Les principales étapes de ce métabolisme sont schématisées sur la **figure 2**. Dans ce manuscrit, nous ne détaillerons pas l'ensemble de ces étapes. Les données récentes publiées par Blaner (1994) ; Harrison et Hussain (2001) ; Bellovino et al. (2003) ; Marill et al. (2003) ; Li et Tso (2003) ; Paik et al. (2004) et Ross et Zolfaghari (2004) satisferont pleinement ce manque.



**Figure 2 : Métabolisme général de la vitamine A**

(d'après Bellovino et al., 2003)

CRBP : cellular retinol binding protein ; RBP : retinol binding protein ; TTR : transthyrétine ; CEF : cellule étoilée du foie ; CRABP : cellular retinoic acid binding protein ; AR : acide rétinoïque ; RAR : retinoic acid receptor ; RXR : retinoid X receptor



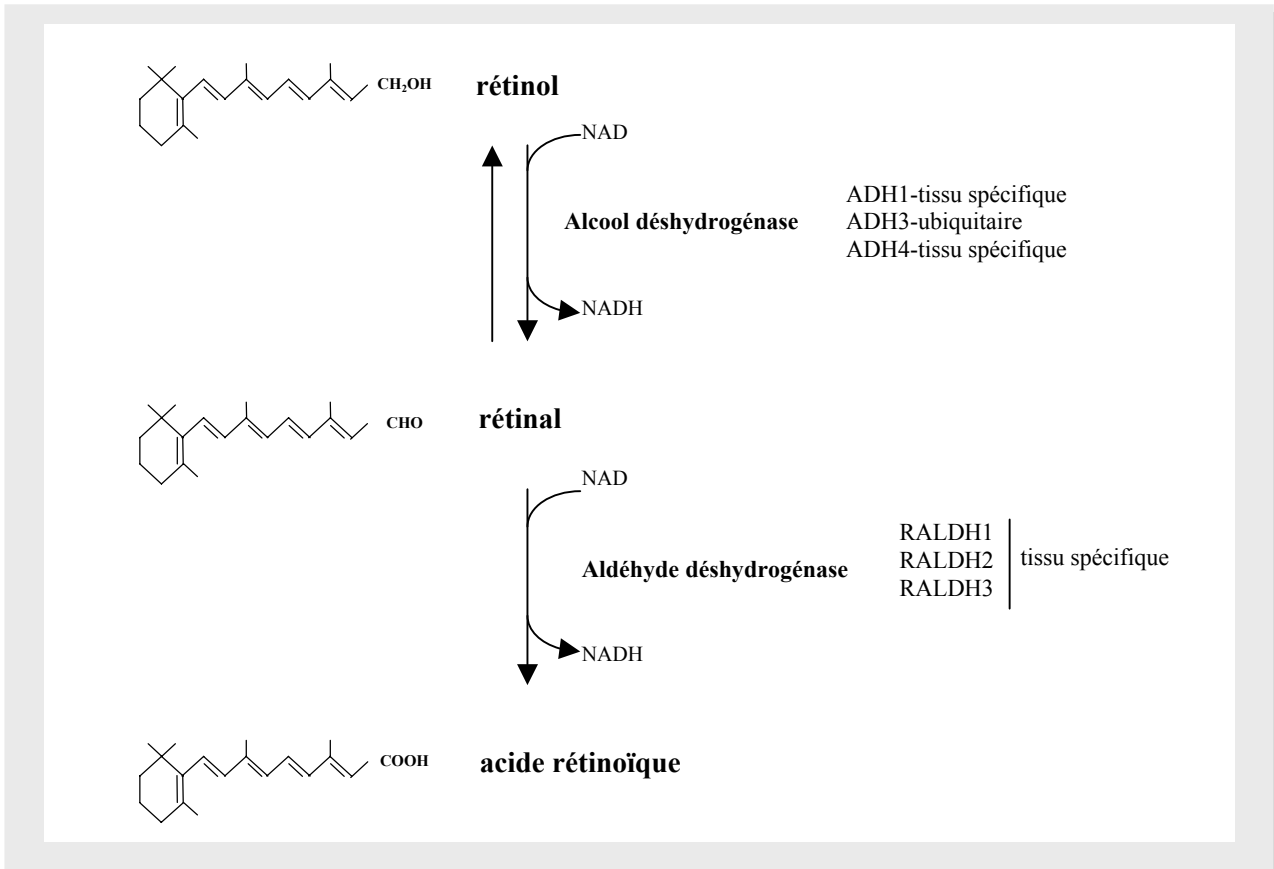
#### **I.1.4. Synthèse de l'acide rétinoïque**

Dans la cellule cible, il existe un métabolisme non oxydatif produisant des rétinyl esters, rétinyl-phosphate, 3-déhydrorétinol ainsi qu'un métabolisme oxydatif donnant du rétinol puis de l'acide rétinoïque (AR), métabolite considéré comme le dérivé actif de la vitamine A (**Figure 3**). Il a été décrit des voies cytosoliques et microsomales dans le processus d'oxydation du rétinol en acide rétinoïque.

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 al., 1993 ; Yang et al., 1994 ; Ross et al., 2001). Les enzymes impliquées dans cette première étape de synthèse de l'AR ne sont pas encore bien définies et il existe de nombreux candidats. Des études génétiques *in vivo* sur des souris indiquent des rôles physiologiques des ADH1 et ADH4 (revue dans Duester et al., 2003).

Une voie microsomale de métabolisation du rétinol en rétinaldéhyde a également été mise en évidence. Le rétinol lié à la protéine de liaison cytosolique CRBP ("cellular retinol binding protein") est un substrat de deux déshydrogénases microsomales NADP(H) dépendantes, dénommées, RoDH1 ou RDH1 et RoDH2 ou RDH2, qui appartiennent à la famille des SDR (Short-Chain dehydrogenase/reductase) (Napoli, 1999). Récemment, il a été montré qu'une SRD, la RDH5, permettrait la production du 11-*cis* rétinol, nécessaire pour la vision (Duester, 2000). La RDH4 serait capable d'oxyder, entre autres, le rétinol tout-*trans* (Ross et al., 2001). De plus, Chen et al. (2000) mettent en évidence l'implication de cytochromes P450 dans la conversion du rétinol en rétinol. La contribution de ces deux voies dans la métabolisation du rétinol varie selon les auteurs (Napoli, 1996 ; Duester, 1996).

Le rétinaldéhyde peut ensuite être converti de manière irréversible en AR par des aldéhydes déshydrogénases (ALDH) cytosoliques de classe I (Chen et al., 1994). Par la suite, certaines ALDH ont été identifiées comme étant spécifiques du rétinol (McCaffery et Dräger, 1995 ; Zhao et al., 1996) et ont été renommées. Ainsi, des études génétiques *in vivo* montrent que la Raldh1 et la Raldh2, parmi un certain nombre de candidats potentiels *in vitro*, seraient également impliquées dans la synthèse d'AR (revue dans Duester et al., 2003). 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 rétinol en AR (Zhang et al., 2000).



**Figure 3 : Voies de biosynthèse de l'acide rétinoïque**

(d'après Duester et al., 2003)

#### *Homéostasie de l'AR*

Dans les tissus cibles, la concentration de l'AR est finement contrôlée, permettant à la fois une régulation de son action nucléaire mais aussi une protection de la cellule contre un excès d'AR. L'homéostasie de l'AR est due à différents contrôles sur de nombreux acteurs intervenant au cours de sa mobilisation et de sa métabolisation. Plusieurs études mettent en évidence l'implication de l'enzyme qui catalyse la conversion du rétinol dans sa forme de stockage (Lécithine : Rétinol Acétyl Transférase - LRAT) dans l'homéostasie de l'AR (Zolfaghari et Ross, 2000). Plusieurs isoformes de cytochromes P450 qui permettent de métaboliser l'AR et diverses protéines de liaison du rétinol ou de l'AR (RBP, CRBP-I et II et CRABP-I et II) sont également impliquées dans l'homéostasie de l'AR (Bavik et al., 1996 ; Ghyselinck et al., 1999 ; Murray et al., 2001 ; Noy, 2000 ; Budhu et Noy, 2002 ; Ross, 2003). De plus, il a été montré la présence d'un élément de réponse RARE dans le promoteur du

gène humain de l'ADH3 (Duester et al., 1991) suggérant un rétrocontrôle positif de l'AR sur la transcription du gène ADH3 et donc sur sa propre synthèse.

L'AR est le principal métabolite actif de la vitamine A et exerce, au niveau des cellules, diverses fonctions de régulations. Il pénétrerait dans le noyau soit librement, soit lié à la CRABP-I ou à la CRABP-II ("cellular retinoic acid binding protein"), qui vont délivrer le ligand de manière passive ou par un processus collisionnel dans le second cas (Dong et al., 1999 ; Noy, 2000).

### **I.1.5. Métabolisme cérébral de la vitamine A**

Le rôle des rétinoïdes, dans le développement du système nerveux central (SNC) est aujourd'hui bien établi (revue dans Maden et Hind, 2003). En revanche, ce n'est que récemment qu'il a été montré que l'AR intervient dans la physiologie du cerveau adulte et un fort courant de recherche vise à mieux comprendre son rôle dans les processus neurobiologiques et cognitifs. En 1997, Connor et Sidell révèlent que le métabolisme des rétinoïdes est actif dans le cerveau humain mature et mettent en évidence la présence de rétinol et surtout de rétinyl ester dans l'hippocampe.

#### I.1.5.1. Présence des protéines de liaison des rétinoïdes

Zetterström et al. (1994) décrivent la distribution des CRBP-I et CRABP-I dans les différentes structures du cerveau adulte du rat. Il apparaît que ces protéines ne sont pas strictement co-localisées. En effet, la CRABP-I semble jouer un rôle important dans le striatum, alors que la CRBP-I est plus abondante dans l'hippocampe, l'amygdale, la substance noire, et les cellules pyramidales du cortex. La présence de ces deux protéines de liaison dans les dendrites, les axones et les terminaisons nerveuses suggèrent un rôle dans le transport axonal et dendritique de l'AR. Cette même équipe a précisé ces premiers résultats quelques années plus tard (Zetterström et al., 1999). Ainsi, la répartition de l'expression de CRBP-I et de CRABP-I au niveau protéique correspond étroitement à celle des transcrits. Par ailleurs, la présence de CRABP-II dans le striatum (Toresson et al., 1999) suggère un rôle important des rétinoïdes dans cette structure chez l'adulte.

Les enzymes déshydrogénases ADH1 et ADH4 ont été identifiées dans diverses régions cérébrales telles que le cervelet, le cortex et l'hippocampe (Martinez et al., 2001). Par ailleurs, les Raldh1, Raldh2 et Raldh3 ont des distributions distinctes: la Raldh1 et la Raldh2 sont présentes dans l'hippocampe; le striatum contient exclusivement la Raldh1 (McCaffery et Dräger, 1994). Ces données font apparaître le striatum comme une des régions du cerveau la plus riche en AR (Wagner et Dräger, 2002). 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.

#### I.1.5.2. Synthèse de l'acide rétinoïque

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). Différentes études ont montré que l'AR peut être synthétisé *de novo* dans le cerveau adulte. C'est le cas notamment d'une étude montrant 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 al., 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).

Cependant, le statut vitaminique A semble déterminant dans la localisation tissulaire de la synthèse d'AR. En effet des résultats divergents ont été obtenus dans des conditions d'apports suffisants de vitamine A chez le rat (Kurlandsky et al., 1995). Cette étude montre que 90% de l'AR total du cerveau n'est pas synthétisé localement mais provient du pool circulant dans le plasma. Yamagata et al. (1993) avait déjà montré le transport jusqu'au cerveau de l'AR injecté dans la cavité péritonéale. La pharmacologie de l'AR a, par la suite, été clairement définie (Le Doze et al., 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.

### **I.1.6. Catabolisme de l'acide rétinoïque**

Les différentes voies du catabolisme de l'AR sont mal définies. Des réactions de décarboxylation, d'isomérisation, de glucuroconjugaison et d'époxydation conduisent à la formation de métabolites moins actifs comme l'acide 4-oxo rétinoïque, l'acide 18-hydroxy rétinoïque ou l'acide 5,8-époxy tout-*trans* rétinoïque (Fujii et al., 1997 ; Abu-Abed et al., 1998). Les enzymes apparentées au cytochrome P450 semblent permettre la dégradation et l'élimination de l'AR et contribueraient au contrôle du signal rétinoïde (Napoli, 1999 ; revue dans Marill et al., 2003). La CRABP-I serait capable d'activer les enzymes qui catalysent la dégradation de l'AR via un mécanisme encore inconnu (Noy, 2000).

### **I.1.7. Rôles génériques de la vitamine A et de l'acide rétinoïque**

Au cours de ces dernières années, les connaissances sur les fonctions cellulaires de la vitamine A et de l'AR se sont fortement accrues. Le **tableau I** indique les principaux signes cliniques observés en cas de déséquilibre d'apport en vitamine A.

Les incidences physiologiques marquées d'une carence en vitamine A ou à l'inverse d'une intoxication par excès d'apports révèlent l'étendue de l'action des rétinoïdes.

Les fonctions très variées des rétinoïdes sont assurées par trois métabolites actifs essentiels, respectivement le 11-*cis* rétinol et les acides tout-*trans* et 9-*cis* rétinoïque. Le 11-*cis* rétinol (ou rétinène) est l'hème de la rhodopsine, pigment visuel photosensible des cellules en bâtonnet de la rétine, et assure donc un rôle essentiel dans la vision. Mais, les rétinoïdes ont une action essentiellement génomique. En effet, liés à ses récepteurs nucléaires spécifiques, les acides tout-*trans* et 9-*cis* rétinoïque vont médier leurs actions sur la transcription de gènes cibles. Plus de 500 gènes ont été identifiés dans le système de réponse de l'acide rétinoïque ; ce qui explique les effets pléiotropiques de cette molécule (Chytil et Haq, 1990 ; Nagpal et Chandraratna, 1998 ; Balmer et Blomhoff, 2002).

Néanmoins, les rétinoïdes ont été récemment impliqués dans diverses fonctions cellulaires ne faisant pas intervenir leurs récepteurs nucléaires. Par exemple, l'activation de la voie de signalisation de la phosphatidyl-inositol 3 kinase/Akt par l'AR, vraisemblablement par une action extragénomique, a été récemment décrite comme un évènement essentiel à la différenciation neuronale des cellules de neuroblastomes humains en culture (Lopez-Carballo et al., 2002). De même, l'inhibition de l'activation de la protéine kinase C (PKC) par son

interaction indirecte avec l'acide tout-*trans* rétinolique a été démontré *in vitro* et suggère que l'AR pourrait contribuer à la régulation de l'activité de cette kinase (Radomska-Pandya et al., 2000). Les voies de signalisation de la phosphatidylinositol 3 kinase/Akt et de la PKC contrôlent des fonctions cellulaires à différents niveaux, et la modulation de ces voies de signalisation par l'AR pourrait entraîner des changements spécifiques dans le métabolisme cellulaire.

**Tableau I : Esquisse des symptômes observés en cas de déficience ou d'excès en vitamine A**

	<b>Déficience en vitamine A</b>	<b>Excès de vitamine A</b>
Peau	Lésions cutanées	Desquamation cutanée et du cuir chevelu
Vision	Xérophtalmie Cécité nocturne	Troubles visuels
Alimentation	Anorexie	Anorexie, vomissements, douleurs abdominales
Croissance	Ralentissement	Troubles chez l'enfant
Reproduction	Troubles de la spermatogenèse	Risque de tératogenèse

## I.2. LA TRIIODOTHYRONINE : LA FORME ACTIVE DES HORMONES THYROÏDIENNES

### I.2.1. Synthèse des hormones thyroïdiennes et mise en réserve

Le nom "thyroïde" provient du grec *thyros* qui signifie bouclier, en référence à la forme en papillon du bouclier que portaient les guerriers grecs.

La synthèse des hormones thyroïdiennes (HT) comporte deux étapes principales : l'iodation des résidus tyrosyls de la thyroglobuline et le couplage de ces résidus pour former les hormones. Les HT (T4 et T3 ; **Figure 4**) sont produites par les cellules épithéliales de la glande thyroïde (Bocian-Sobkowska et al., 1997).

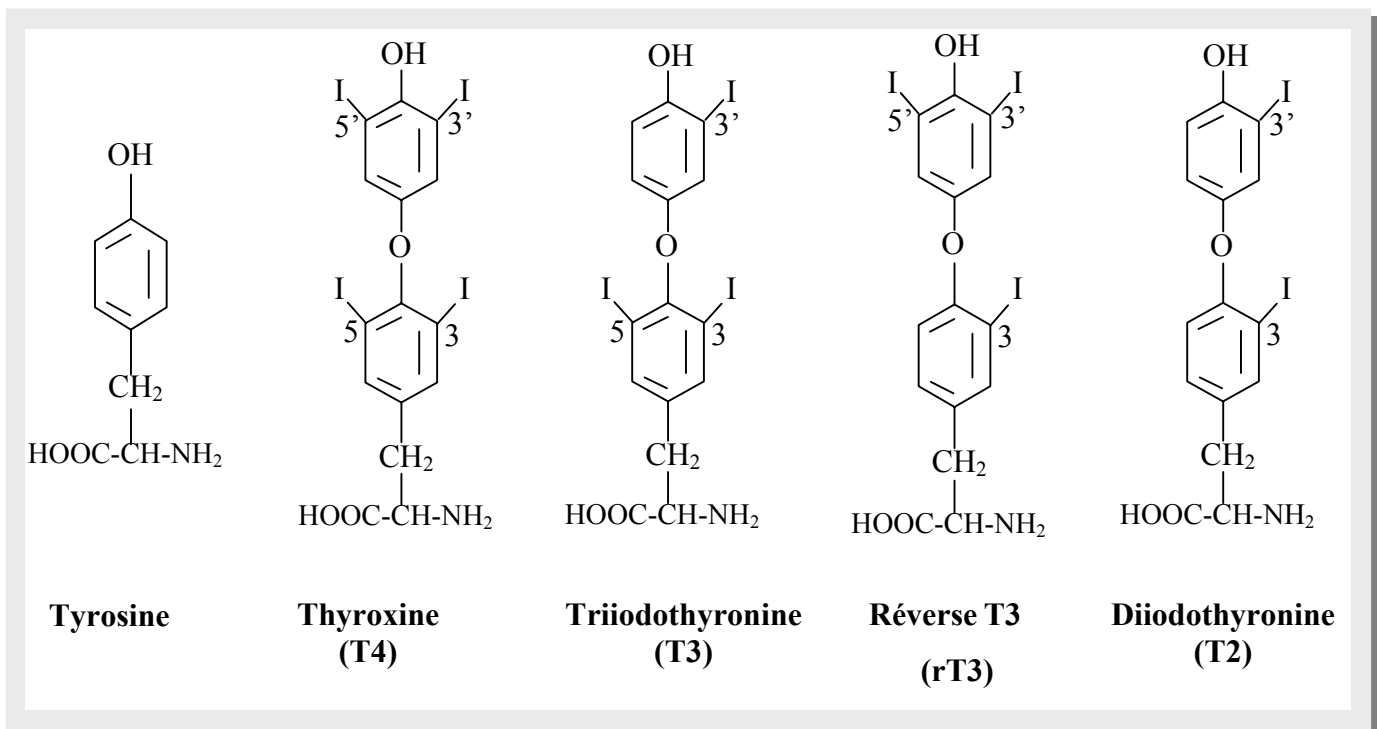


Figure 4 : Structure des hormones thyroïdiennes et de leurs dérivés

L'iode est indispensable à la synthèse des HT. Il est apporté par l'alimentation sous forme d'iodure  $I^-$  ou d'iodate  $IO_3^-$  qui sont absorbés par les entérocytes. Les recommandations d'apport en iode vont de 150  $\mu\text{g}/\text{jour}$  pour un adulte jusqu'à des doses plus importantes lors de la grossesse et de l'allaitement (ANC, 2001).

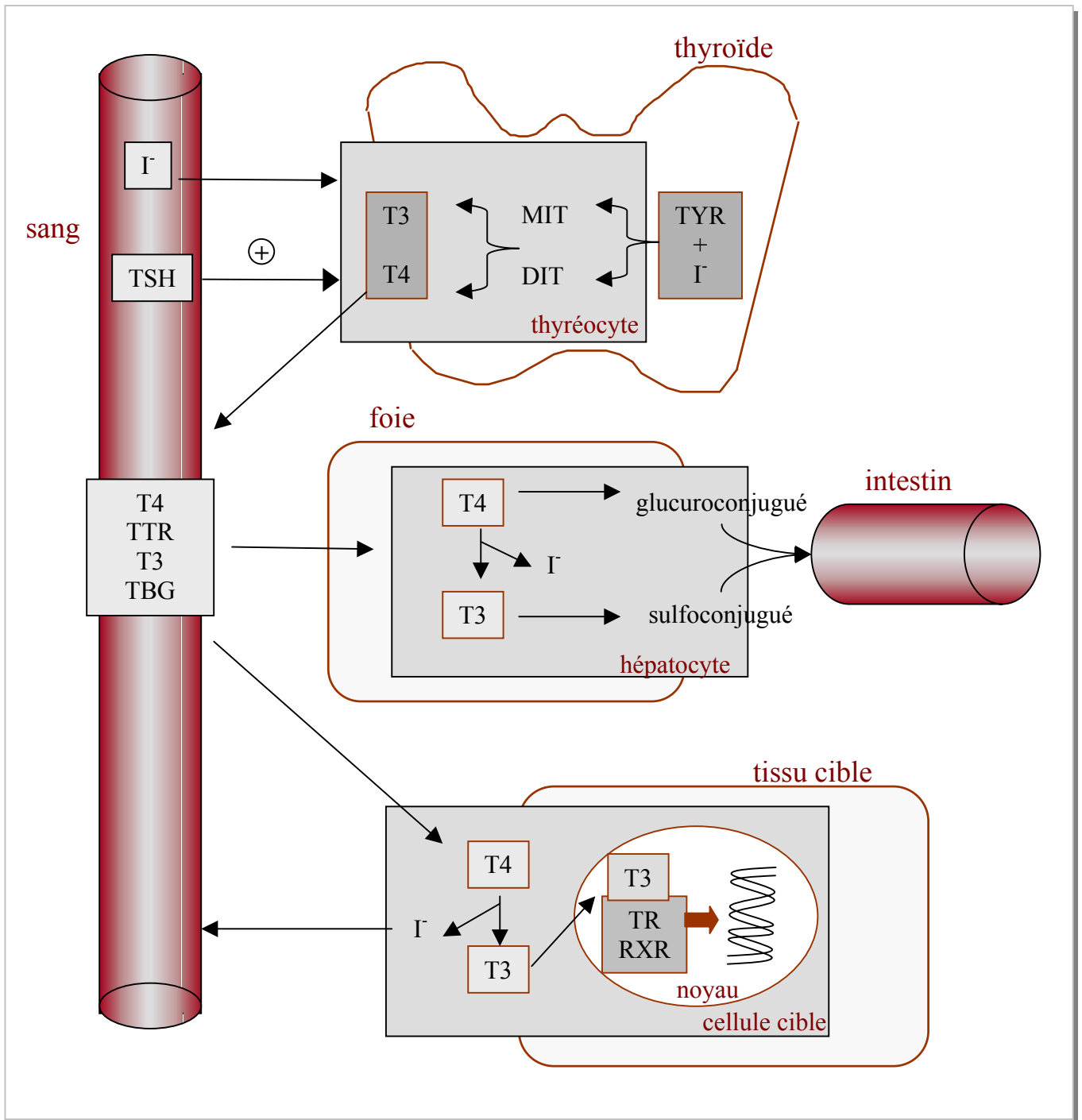
La captation de l'iode se fait préférentiellement par la thyroïde et est liée au cotransport de sodium pour la traversée de la membrane basale dans la colloïde (Dai et al., 1996 ; Smanik et al., 1996). L'iodure est activé par la thyropéroxydase (TPO) en  $I^0$  ou  $I^+$  qui se fixent sur les résidus tyrosyls de la thyroglobuline pour former des résidus monoiodothyrosine (MIT) ou diiodothyrosine (DIT) (Gavaret et al., 1981 ; Sugawara et Hagen, 1982). Un résidu de monothyrosine (MIT) et un résidu de diiodothyrosine (DIT) se combinent pour former la 3,3',5-triiodothyronine (T3), alors que deux résidus de DIT forment la 3,3',5,5'-tétraiodothyronine ou thyroxine (T4). L'ensemble thyroglobuline avec ses molécules T3, T4, MIT et DIT est alors mis en réserve dans la colloïde. La T4 peut être considérée comme la forme de stockage la plus importante du fait de sa transformation régulée en T3, de sa liaison forte avec des protéines plasmatiques et de sa longue demi-vie (7 jours) (Thomopoulos, 1998).

### **I.2.2. Sécrétion des hormones thyroïdiennes et synthèse de la triiodothyronine**

La thyroglobuline est hydrolysée par des enzymes protéolytiques libérant ainsi les HT qui sont ensuite sécrétées dans la circulation sanguine (Taura et al., 1986 ; Taurog, 1996). La grande majorité des HT secrétées est sous forme T4, qui est dite "forme circulante" alors que la T3 est considérée comme la "forme active". Chez l'homme, le principal transporteur des HT est la globuline se liant à la thyroxine (TBG, 75% du transport total des HT). Les deux autres transporteurs sont la transthyrétine (TTR) et l'albumine (Osoimehin et Awotedu, 1981). Chez le rat, la TTR est la principale protéine de transport des HT (revue dans Refetoff et Nicoloff, 1995). Les HT seraient également transportées pour une petite partie par des lipoprotéines (HDL, LDL, VLDL) (Benvenega et al., 2001).

Toutes ces protéines de liaison plasmatiques permettent le maintien d'un taux d'hormones libres constant protégeant ainsi le corps de toute variation abrupte.





**Figure 5 : Métabolisme général des hormones thyroïdiennes**

TYR : thyroglobuline ; MIT : monoiodotyrosine ; DIT : diiodotyrosine ;  $I^-$  : iodure ; T3 : 3,5,3'-triiodothyronine ; T4 : 3,5,3',5'-tétraiodothyronine ; TBG : thyroxin binding globulin ; TTR : transthyrétine ; TSH : thyroestimuline hypophysaire qui stimule la glande thyroïde (+) ; TR : récepteur nucléaire de la triiodothyronine

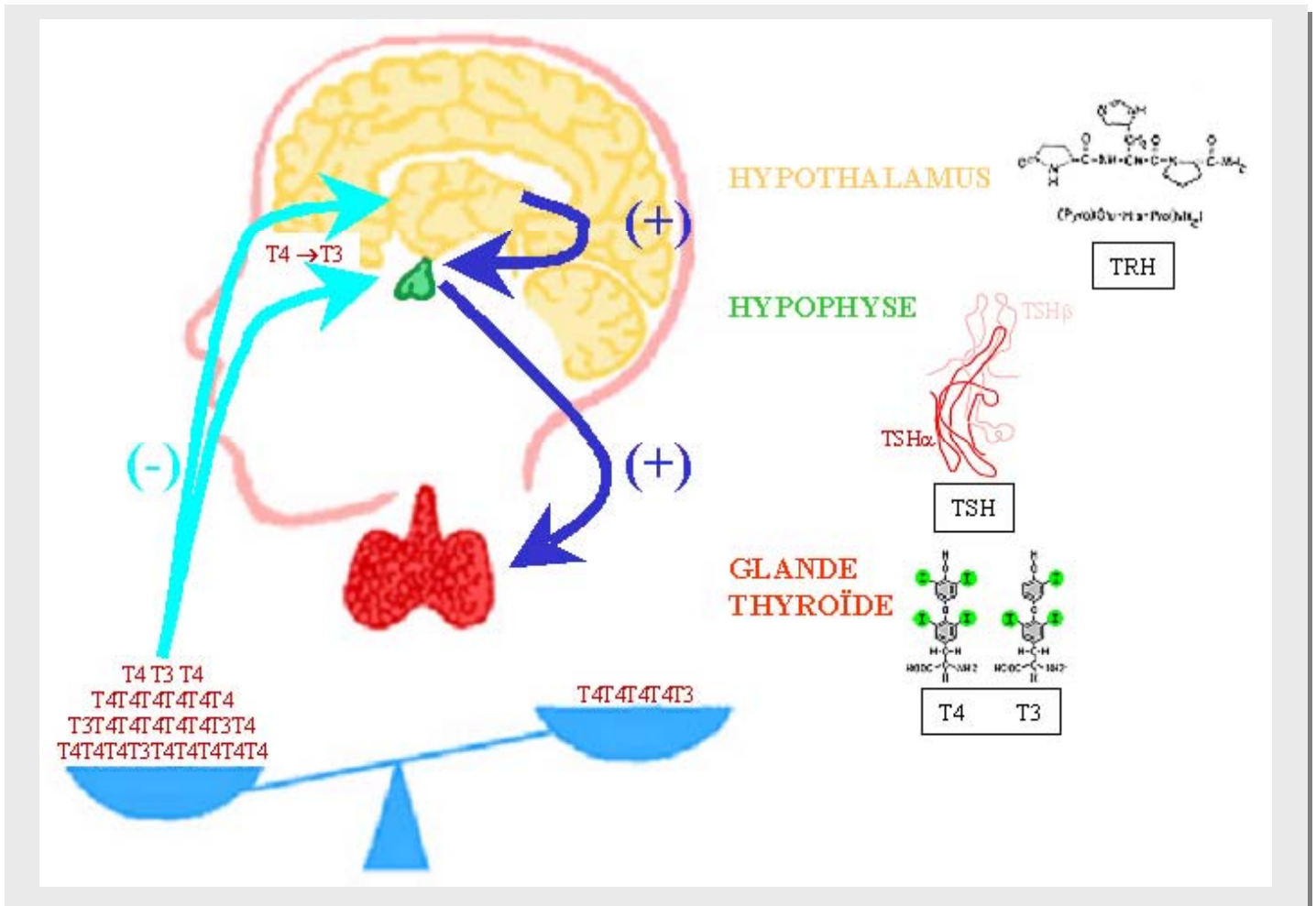
### *Captation tissulaire et transformation de T4 en T3*

Les taux sériques des HT et leur délivrance aux organes cibles sont directement proportionnels aux concentrations et aux affinités des protéines de liaison et inversement proportionnels à leur saturation (Ekins, 1985). La T4 et la T3 sous forme libre sont captées par les tissus par des mécanismes mal connus. La TTR aurait un rôle important dans la captation des HT grâce à des récepteurs spécifiques à la surface des cellules (Divino et Schußler, 1990). Les lipoprotéines HDL permettraient la diffusion facilitée des HT au travers de la membrane cellulaire (Benvenga et al., 2002). De plus, des études récentes laissent supposer que la captation des HT par la cellule cible ferait intervenir un transporteur énergie dépendant, saturable et stéréospécifique (Hennemann et al., 2001 ; Ritchie et al., 2003). A l'intérieur de la cellule, la plus importante voie de production de la T3 se fait par désiodation de la T4 par des 5'-désiodases (Oppenheimer et al., 1972 ; revue dans Kohrle, 2000). Trois isoformes de désiodases ont été identifiées (DI, DII, DIII) ; chacune variant selon la spécificité du substrat, le produit de la réaction, la localisation cellulaire et la cinétique enzymatique (Lazar, 1993). Le type désiodase I, présent majoritairement dans le foie et les reins, est responsable de l'essentiel de la production de T3 circulante (Mandel et al., 1992 ; Larsen et Berry, 1995). Les niveaux intracellulaires de T3 dépendent des activités relatives de chaque désiodase permettant ainsi une régulation fine au niveau de chaque cellule cible (revue dans Bianco et al., 2002 ; Chassande, 2003). Les différentes étapes du métabolisme des HT sont résumées sur la **figure 5**.

### **I.2.3. Régulation de la synthèse des hormones thyroïdiennes**

La régulation de la sécrétion des HT est exercé par un retro-contrôle négatif classique (Shupnik et al., 1989) faisant intervenir l'hormone de stimulation de la thyroïde (TSH) ou thyrotropine synthétisée par l'hypophyse antérieure et l'hormone de libération de la TSH (TRH) produite par l'hypothalamus (Fisher et al., 2000). Le fonctionnement de cet axe hypothalamo-hypophyso-thyroïdien est illustré sur la **figure 6**. L'augmentation de la concentration en HT dans le sang inhibe à la fois la synthèse de la TRH et de la TSH menant à un arrêt de la sécrétion de T4 et T3. Lorsque la concentration sérique en HT diminue, le signal de rétro-contrôle négatif s'affaiblit et la sécrétion de TRH augmente (revue dans Yen, 2001). Cet axe neuroendocrinien est soumis à l'influence de nombreux facteurs modulateurs, comme par exemple la concentration en iode, le froid, le stress. Lors de l'exposition au froid,

l'augmentation de la TSH et des HT est liée à la libération de noradrénaline, qui stimule la synthèse de TRH.



**Figure 6 : Le rétro-contrôle de l'axe hypothalamo-hypophysio-thyroïdien**  
 (d'après Shupnik et al., 1989)

#### **I.2.4. Catabolisme des hormones thyroïdiennes**

Une étape clé de la régulation de l'inactivation locale des HT est la transformation par désiodation (désiodase de type III) de la T4 et de la T3 en formes inactives : réverse T3 (rT3 ou 3,3',5'- triiodothyronine) et diiodothyronine (3,3'-T2) (**Figure 4**) (Santini et al., 2001). La T3 et la T4 sont aussi inactivées par glucuronoconjugaison et sulfatation. Elles peuvent être également métabolisées en TRIAC (triodo acétique acide) et TETRAC (tétraïodo acétique acide) qui conservent une activité thyromimétique (Juge-Aubry et al., 1995).

#### **I.2.5. Métabolisme cérébral des hormones thyroïdiennes**

##### I.2.5.1. Transport du sang vers le cerveau

Des études ont montré que la majorité de la T4 trouvée dans le cerveau provient directement du sang (Blay et al., 1993). Bien que le mécanisme précis reste controversé, le passage des HT au travers de la barrière hémato-encéphalique est aujourd'hui admis (Cheng et al., 1994). Récemment, Sugiyama et al. (2003) ont mis en évidence l'existence d'un transporteur de haute affinité pour la T4 lui permettant de traverser cette barrière. Le transport des HT pourrait faire intervenir certaines protéines comme la TTR (revue dans Schreiber, 2002 ; Bernal, 2002) ou la protéine p29, sous-unité du complexe de la désiodase de type II (Montero-Pedrazuela et al., 2003).

##### I.2.5.2. Synthèse de la triiodothyronine

Dans le cerveau, plus de 80% de la T3 provient de la désiodation de la T4 par une 5'-désiodase de type II (Crantz et al., 1982 ; revue dans Bianco et al., 2002). Cette désiodase de type II est en effet localisée dans le cerveau et l'hypophyse (Larsen et Berry, 1995) et est responsable de la production locale de T3. Le type désiodase III est également présent dans le cerveau et permet le maintien de concentrations physiologiques d'HT grâce à leur catalyse (St Germain et al., 1994 ; Croteau et al., 1995 ; revue dans Bernal et al., 2003).

### I.2.6. Rôles génériques des hormones thyroïdiennes

Les HT assurent des fonctions essentielles dans les processus de croissance, de différenciation et dans le métabolisme basal (Oppenheimer, 1999 ; revue dans Yen, 2001).

Les effets des HT sont très complexes et sont surtout connus par les conséquences observées en cas de déficience ou d'excès en HT. Le **tableau II** résume les différents signes cliniques associés à un déséquilibre en HT.

**Tableau II : Esquisse des symptômes observés en cas de déficience ou d'excès en hormones thyroïdiennes**

	Déficience en HT	Excès en HT
Croissance staturo-pondérale	Défaut d'ossification	Risque d'ostéoporose
Métabolisme basal	Diminué	Accéléré
Thermogénèse	Consommation O <sub>2</sub> diminuée	Consommation O <sub>2</sub> augmentée
Cœur	Ralentissement du rythme cardiaque	Accélération du rythme cardiaque
Muscle strié	Ralentissement de la contraction	Fonte musculaire
Tissu adipeux	Prise de poids	Perte de poids
Maturation du SNC	Crétinisme	Excitation et agressivité

Une régulation précise de l'activité des HT est nécessaire du fait de leurs nombreuses conséquences sur l'ensemble du métabolisme. Malgré tout, les maladies thyroïdiennes, hypo- ou hyperthyroïdies, et les désordres thyroïdiens subcliniques ne sont pas rares (Surks et al., 2004). La conséquence la plus fréquente d'une carence en iode est le goitre qui représente une hypertrophie compensatrice de la thyroïde (Ingenbleek et al., 1980 ; Knudsen et al., 2002).

Les HT ont principalement une action génomique par l'intermédiaire de la T3 et de sa liaison à des récepteurs nucléaires spécifiques (TR) qui agissent en tant que facteur de transcription (revue dans Yen, 2001). Ces actions nucléaires seront détaillées dans la partie II (chapitre I). La transcription du génome mitochondrial serait aussi régulée en partie par les

HT où elles stimuleraient le métabolisme énergétique (Wrutniak-Cabello et al., 2001 ; revue dans Bassett et al., 2003). Récemment, Mukhopadhyay et al. (2003) ont décrit les activités post-transcriptionnelles des HT.

La T3 n'est pas la seule forme biologiquement active. En effet, la T4, considérée comme une prohormone, peut agir directement sur la synthèse et la dégradation des protéines (Farwell et al., 1996 ; Bogazzi et al., 1997).

Les HT exercent également des actions extra-génomiques ne faisant pas intervenir leurs récepteurs nucléaires. Elles agissent au niveau de la membrane plasmique, des organelles cellulaires et du cytosquelette. A titre d'exemple, les HT agissent sur le transport de divers solutés ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , glucose) et sur les activités de nombreuses kinases (PKC, kinases AMPc-dépendantes, pyruvate kinase). Dans le cytoplasme, les HT modulent la respiration mitochondriale. Enfin, au niveau du cytosquelette, elles interviennent dans la régulation de la polymérisation des filaments d'actine en actine-F (revue dans Davis et Davis, 1996). Les mécanismes moléculaires par lesquels les HT agissent ne sont pas encore entièrement élucidés.

## **II. MODE D'ACTION NUCLEAIRE DE L'ACIDE RETINOÏQUE ET DE LA TRIODOTHYRONINE**

### **II.1. LA SUPERFAMILLE DES RECEPTEURS NUCLEAIRES**

Deux systèmes hormonaux principaux sont rencontrés dans les cellules : (i) les hormones hydrophiles qui ne traversent pas la membrane cellulaire et se lient à des récepteurs membranaires, déclenchant une cascade biochimique de seconds messagers ; (ii) les hormones lipophiles, capables de traverser la membrane cellulaire, vont agir directement dans le noyau, en se liant à des récepteurs spécifiques. La présentation de ces récepteurs nucléaires fait l'objet de ce chapitre.

Des données bibliographiques ont permis d'établir que les hormones stéroïdes et thyroïdiennes agissent dans les cellules cibles principalement par l'intermédiaire de récepteurs nucléaires pour réguler la synthèse d'ARN messagers spécifiques. Les récepteurs nucléaires sont des protéines 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 (revue dans Mangelsdorf et Evans, 1995). La caractérisation de ces récepteurs nucléaires, dont les premiers clonés furent le récepteur des glucocorticoïdes (GR) (Hollenberg et al., 1985 ; Miesfield et al., 1986) et le récepteur des œstrogènes (ER) (Green et al., 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 les acides gras et éicosanoïdes. En plus de ces récepteurs dont les ligands sont connus, de nombreux travaux de clonage ont permis d'identifier des gènes inconnus jusqu'alors et homologues aux gènes codant pour les récepteurs nucléaires. Les ligands des protéines codées par ces gènes n'étant pas encore connus, ces récepteurs ont été regroupés sous le terme de récepteurs

orphelins (revue dans Enmark et Gustafsson, 1996) ; pour certains d'entre eux leur(s) ligand(s) ont récemment été trouvés (revue dans Laudet et Vanacker, 1999) (**Tableau III**).

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

Récepteurs nucléaires	Substance activatrice	Récepteurs orphelins
AR	Androgènes	EAR-1
ER	Oestrogènes	EAR-2
GR	Glucocorticoïdes	EAR-3 (COUP-TFI)
MR	Minéralocorticoïdes	ERR-1
PR	Progestérone	ERR-2
RAR $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$	Acide tout- <i>trans</i> rétinolique	HNF4
RXR $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$	Acide 9- <i>cis</i> rétinolique	NGF1B (NUR77)
TR $\alpha$ , $\beta$	Triiodothyronine	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	

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 rétinolique tout-*trans* ; RXR : récepteur de l'acide 9-*cis* rétinolique ; 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

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 accord avec leurs propriétés de liaison au ligand, de liaison à l'ADN et de dimérisation. La première classe comprend les récepteurs des hormones stéroïdiennes (récepteurs 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 al., 2002). Dans cette nouvelle classification, les récepteurs de l'acide tout-*trans* rétinoïque (RAR) et ceux de 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**

Les récepteurs nucléaires présentent une forte homologie de structure, avec quatre domaines principaux possédant divers degrés de conservation entre les différents membres de la superfamille (voir **figure 7**).

- Le domaine A/B : ce domaine, impliqué dans la transactivation de manière indépendante du ligand (Nagpal et al., 1992), 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 (C<sub>I</sub> et C<sub>II</sub>), composés chacun d'un atome de zinc chélaté par quatre résidus cystéines, jouent un rôle complémentaire 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 (Hirst et al., 1992).

- Le domaine D : cette région charnière entre le domaine C et E permet la réalisation de différentes configurations fonctionnelles et pourrait être impliquée dans la localisation nucléaire des récepteurs (Ylikomi et al., 1992).

- 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. La partie centrale du domaine E riche en leucine serait destinée à la dimérisation (modèle "leucine-zipper"), alors que la régulation de la transcription serait assurée par un domaine dénommé Ti. En fait la partie du domaine E qui est impliquée dans la liaison du ligand est très conservée entre récepteurs ayant la même spécificité de liaison mais elle ne possède pas de similarité apparente entre les récepteurs de différents types. A l'inverse le domaine Ti montre une conservation de 20 à 45 % entre tous les récepteurs (O'Donnell et Koenig, 1990).

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 (O'Mallet, 1990) 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 (Sladek et al., 1999 ; Koide et al., 2002). Les RXR semblent être dépourvus de cette région (Bourguet et al., 1995 ; Parrado et al., 2001).

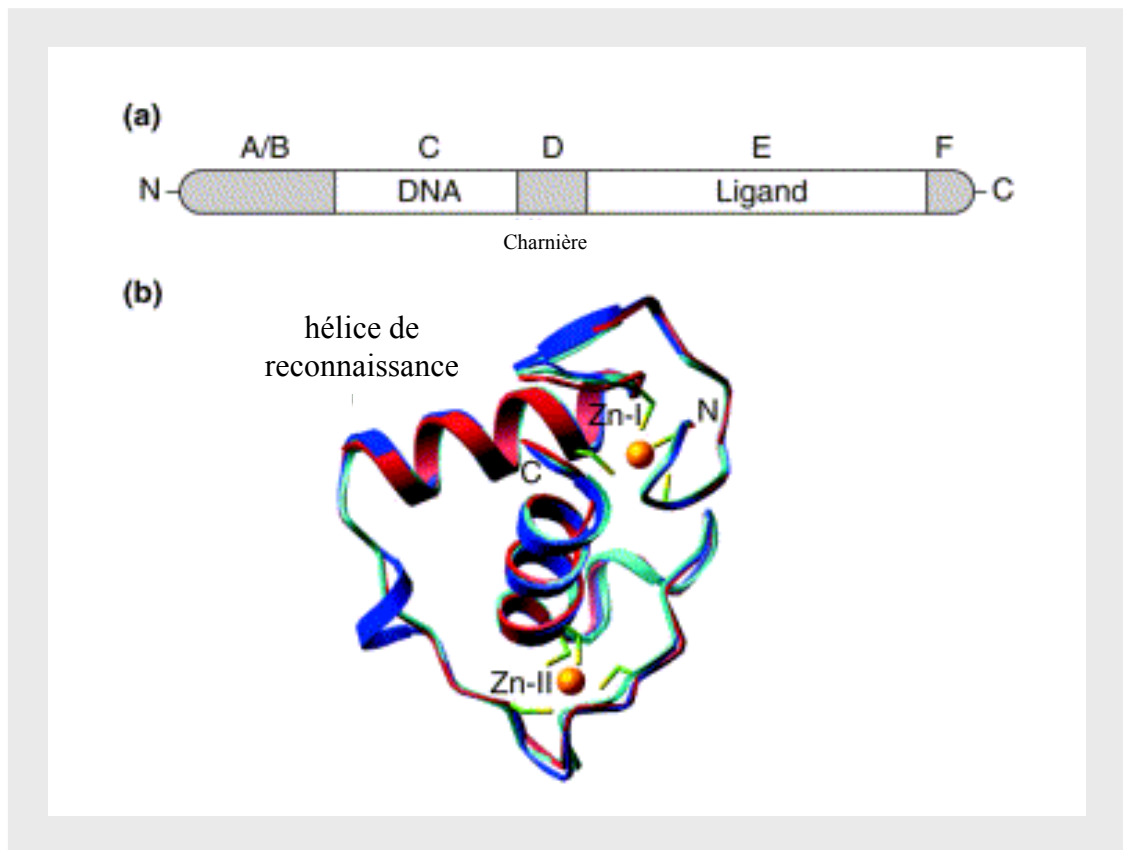


Figure 7 : Architecture des récepteurs nucléaires

(d'après Rastinejad, 2001)

- (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).

### **II.1.3. Mode d'action**

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

Les éléments de réponse aux hormones (HRE) comprennent plusieurs types (GRE, TRE, RARE) selon le ligand responsable de l'activation de la transcription (revue dans Fuller, 1991 ; Lazar, 2003). Leur structure est généralement basée sur un même principe : deux demi 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 al., 1991). Plusieurs motifs peuvent répondre à un même récepteur nucléaire, mais la liaison sera plus ou moins favorisée et la transcription sera régulée différemment. Une particularité attribuée aux récepteurs des HT est qu'ils peuvent se lier en l'absence de ligand à des éléments de réponse qui régulent positivement ou négativement la transcription génique. Ainsi, l'absence ou la présence de T3 influent la transcription génique qui peut être réprimée ou activée par levée d'inhibition (revue dans Bassett et al., 2003).

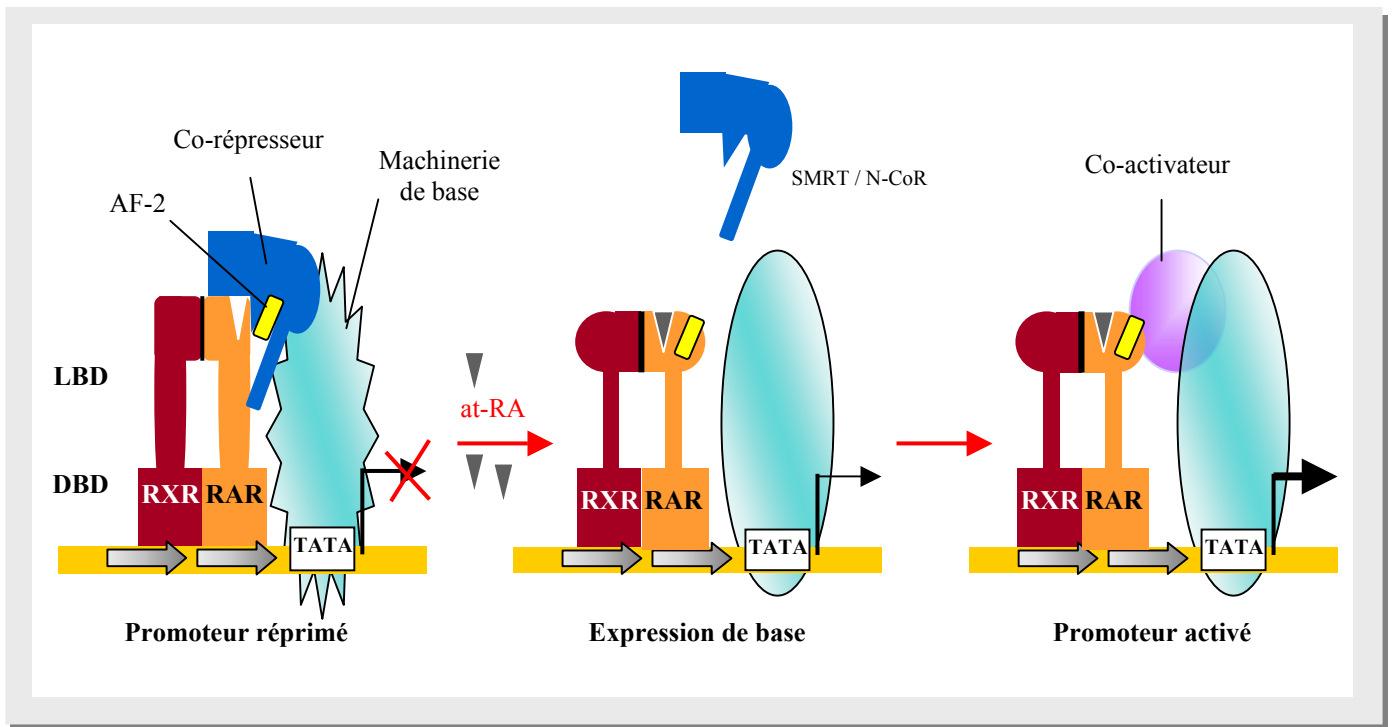
Les éléments de réponse aux hormones thyroïdiennes et à l'AR situés dans le promoteur des gènes cibles lient plus facilement les dimères de récepteurs et donnent lieu à une meilleure activité transcriptionnelle avec des hétérodimères. L'hétérodimérisation la plus importante apparaît être la combinaison avec un autre membre de la superfamille des récepteurs nucléaires, les RXR (Schräder et Carlberg, 1994 ; Forman et al., 1995 ; Chin et Yen, 1997 ; 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.

#### II.1.3.2. Rôle des cofacteurs de transcription

Les travaux de recherche de ces dernières années ont montré que les récepteurs nucléaires sont au centre d'un système complexe de régulation, et que la fixation du ligand n'est pas toujours suffisante pour que le récepteur induise l'expression d'un gène (Katzenellenbogen et al., 1996). Le récepteur doit alors interagir, soit directement, soit indirectement avec la "machinerie" de transcription pour induire l'expression du gène cible. Des protéines appelées cofacteurs de transcription régulent l'activité transcriptionnelle de ces récepteurs, leur permettant soit d'activer (coactivateurs), soit de réprimer (corépresseurs)

l'expression d'un gène. Le nombre des cofacteurs ne cesse d'augmenter depuis leur première découverte (Chen et Evans, 1995 ; Lee et al., 1995), ce qui ne facilite pas la compréhension du mode d'action de ces facteurs avec les récepteurs nucléaires (revue dans Freedman, 1999). La capacité de ces cofacteurs à interagir avec plusieurs récepteurs leur confère un rôle central dans l'intégration des signaux hormonaux, d'autant plus qu'ils sont présents en quantité limitée dans la cellule. Klein et al. (2000) montrent, avec l'exemple des récepteurs de l'AR, que le recrutement des corégulateurs peut varier et serait dépendant de la nature des ligands. En outre, la plasticité avec laquelle les récepteurs et les corégulateurs intègrent et exécutent un programme complexe spatio-temporel d'expression génique pourrait être due à une régulation des corégulateurs eux-mêmes par des kinases (revue dans McKenna et O'Malley, 2002). Ces auteurs montrent également que des corépresseurs pourraient devenir coactivateurs et vice versa.

L'activation des récepteurs nucléaires passe par l'action de ces cofacteurs. 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 8**).



**Figure 8 : Mécanisme d'action des récepteurs nucléaires (RAR et RXR) en présence de cofacteurs de transcription**

(d'après Glass et Rosenfeld, 2000)

LDB : ligand binding domain ; DBD : DNA binding domain ; atRA : acide all-*trans* rétinoïque ; N-coR : nuclear hormone receptor corepressor ; SMRT : silencing mediator for retinoic acid and thyroid hormone receptors ; AF-2 : activation function 2 domain.

## **II.2. LES RECEPTEURS DE L'ACIDE RETINOÏQUE**

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

### **II.2.1. Les différents types de récepteurs**

La complexité du signal rétinoïde tient de l'existence d'une grande diversité de 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 ( $K_d = 10$  nM) (Ishikawa et al., 1990 ; Yang et al., 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 ( $K_d = 1-5$  nM) (Heyman et al., 1992 ; Levin et al., 1992). La masse moléculaire de ces récepteurs est d'environ 50 kDa. Pour chacun de ces récepteurs, trois types de protéines ont été isolés, codées 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 formes sont très similaires dans les domaines B, C, D et E mais diffèrent 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 (Giguère, 1994 ; revue dans Chambon, 1996).

### **II.2.2. Distribution tissulaire**

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

La distribution des différentes isoformes chez l'adulte est aussi spécifique. 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 muscle. 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 (revue dans Wan, 1993).

Différents travaux ont permis de préciser la répartition des récepteurs nucléaires des rétinoïdes (RAR, RXR) dans le cerveau adulte. Les techniques d'immunorévélation font apparaître que le taux le plus élevé de ces récepteurs a été observé dans le striatum, où les isoformes RAR $\beta$  et RXR $\gamma$  sont les plus abondantes chez le rat et la souris (Krezel et al., 1999 ; Zetterström et al., 1999 ; Moreno et al., 2004). Yamagata et al. (1993) avaient déjà montré que l'isoforme RAR $\beta$  est la plus exprimée dans le cerveau mature de rat, principalement dans le cortex cérébral, le cervelet et le striatum, et est présente à des taux très bas dans l'hippocampe. En revanche dans cette structure, les récepteurs RAR $\alpha$ , RAR $\gamma$  et RXR $\beta$  ont été majoritairement identifiés (Krezel et al., 1999 ; Zetterström et al., 1999).

Il est à noter que certaines localisations de ces protéines ne sont pas corrélées avec la distribution des transcrits correspondants (Krezel et al., 1999). Ceci laisse à supposer une régulation post-transcriptionnelle de ces récepteurs, qui contribue à leur localisation spécifique dans le cerveau. 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.

Comme il l'a été montré pour la "machinerie biochimique" de synthèse de l'AR, le profil d'expression des protéines et des transcrits des récepteurs, dans le cerveau en cours de développement et dans le cerveau adulte, sont différents (Ruberte et al., 1993 ; Dolle et al., 1994 ; Yamagata et al., 1994 ; Toresson et al., 1999 ; Garel et al., 1999 ; Mollard et al., 2000). A titre d'exemple, l'isoforme RAR $\beta$  est présente dans l'hippocampe chez l'embryon, alors qu'elle est peu exprimée dans cette structure chez l'adulte. L'abondance de RAR $\alpha$  dans le striatum en cours de développement contraste avec son absence dans le striatum mature.

## **II.3. LES RECEPTEURS DE LA TRIIODOTHYRONINE**

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

C'est en 1986 que furent clonés pour la première fois les récepteurs nucléaires de la triiodothyronine (TR) (Sap et al., 1986 ; Weinberger et al., 1986). Ils sont codés par deux gènes différents appelés TR $\alpha$  et TR $\beta$  ou *c-erbA $\alpha$*  et *c-erbA $\beta$*  en raison de leur homologie avec l'oncogène viral *V-erbA*. La constante d'association à l'équilibre ( $K_a = 2.10^9 \text{ M}^{-1}$ ) prouve que les TR ont une très haute affinité pour leur ligand (Torresani et al., 1975). TR $\alpha$  et TR $\beta$  sont extrêmement conservés entre les espèces ; ce qui dénote de leur nécessité dans le développement et le métabolisme normal d'un individu (Lazar, 1993). Chacun d'eux subit un épissage alternatif générant plusieurs ARNm codant pour des protéines ayant des fonctions réceptrices différentes. La transcription du gène TR $\alpha$  produit deux ARNm majoritaires qui sont ensuite traduits en TR $\alpha_1$  et TR $\alpha_2$  respectivement (Mitsubishi et al., 1988). La protéine TR $\alpha_2$  se différencie de TR $\alpha_1$  puisqu'elle ne lie pas la T3. Par contre, elle se fixe sur le TRE (revue dans Yen et Chin, 1994) et inhibe alors la transcription du gène (Izumo et Mahdavi, 1988 ; Koenig et al., 1989). En plus de ces deux formes majoritaires, deux protéines tronquées ont été mises en évidence : TR $\Delta\alpha_1$  et TR $\Delta\alpha_2$  (Chassande et al., 1997). Ces deux protéines sont inaptes à se lier au TRE et à transactiver l'expression génique. La particularité du gène TR $\alpha$  est que le brin opposé est aussi transcrit et traduit en une protéine appelée *rev-erbA* (Lazar et al., 1989 ; Miyajima et al., 1989). Cette protéine n'a pas de fonction réceptrice mais se lie au TRE et induit une transrépression (Harding et Lazar, 1995).

L'épissage alternatif du gène TR $\beta$  génère aussi plusieurs protéines dont deux majoritaires : TR $\beta_1$  et TR $\beta_2$  codées par deux ARNm différents (Hodin et al., 1989). Toutes deux lient la T3 mais diffèrent par leur région N-terminale, leur conférant des activités transcriptionnelles différentes (Koenig et al., 1988 ; Lazar, 1993).

Récemment, deux autres récepteurs ont été clonés à partir d'une banque génomique de rat : TR $\beta_3$  et TR $\Delta\beta_3$  (Williams, 2000).

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

Les TR $\alpha_1$  et TR $\beta_1$  sont exprimés de manière ubiquitaire dans les tissus de rat, tandis que TR $\beta_2$  est spécifique du lobe antérieur de l'hypophyse et de certaines zones de l'hypothalamus



(Lazar, 1993). La distribution des TR $\alpha$  et TR $\beta$  se distingue surtout au cours du développement où la forme  $\alpha$  est plus précoce. TR $\beta_3$  et TR $\Delta\beta_3$  sont aussi assez largement exprimés (foie, reins, poumons et rate) et montrent des différences d'expression selon les tissus (revue dans Harvey et Williams, 2002).

Dans le cerveau, la distribution des TR (mRNA et protéines) et l'analyse de la capacité de liaison de la T3 aux TR suggèrent une expression neuronale prédominante, mais également astrocytaire (revue dans König et Moura Neto, 2002). La forme majoritaire du cerveau est TR $\alpha$  (Bradley et al., 1989). TR $\alpha_1$  et TR $\alpha_2$  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 al., 1989 ; Cook et Koenig, 1990). Par ailleurs, Puymirat et al. (1991) ont localisé les TR dans le cerveau de rat adulte par immunocytochimie : ils sont présents dans les neurones mais également dans les cellules gliales et dans les plexus choroïdes. Leur distribution est très importante dans les bulbes olfactifs, l'hippocampe, plus particulièrement le gyrus dentelé, le cortex et le noyau amygdalien.

## **II.4. REGULATION DES RECEPTEURS NUCLEAIRES**

### **II.4.1. Auto-régulation**

La concentration en AR détermine le taux d'expression de certains gènes codant pour ses propres récepteurs : c'est le cas des RXR $\alpha$ , RXR $\beta$  et RXR $\gamma$  (Wan et al., 1994; Duprez et al., 1996). L'expression de RAR $\beta$  est fortement induite par l'acide tout-*trans* rétinolique *in vitro* alors que celle de RAR $\alpha$  n'est pas affectée (De Thé et al., 1989). Plusieurs études effectuées chez des animaux carencés en vitamine A montrent une diminution de l'expression des RAR $\beta$ , leur réinduction après l'administration d'AR (Haq et al., 1991), et aucune modification des autres isotypes RAR $\alpha$  et RAR $\gamma$  (Kato et al., 1992 ; Yamagata et al., 1993). Il semble en effet que ces isotypes soient peu sensibles à l'administration d'AR tout-*trans* et ne s'expriment qu'en présence d'une forte concentration de cet acide (Mangelsdorf, 1994). Ballow et al. (2003) confirment que l'expression constitutive de RAR $\alpha_1$  et RAR $\gamma_1$  est insensible à l'administration d'AR dans des lymphocytes en culture. D'autres études physiologiques ont confirmé le phénomène d'autorégulation des récepteurs RAR $\beta$  *in vivo* dans différents tissus (Enderlin et al., 1997a,b).

Les TR présentent l'aptitude de se lier aux TRE en l'absence de ligand leur conférant une capacité de répression de la transcription basale (revue dans Chassande, 2003). Ce phénomène a été récemment suggéré pour les RAR (revue dans Weston et al., 2003). La régulation des ARNm codant pour les différents TR semble dépendante des isoformes et du type cellulaire concerné (Lebel et al., 1993 ; Hodin et al., 1990 ; Sadow et al., 2003). Dans l'hypophyse, la T3 permet une hausse de l'expression des TR $\beta_1$ , et une diminution des TR $\beta_2$  et TR $\alpha_1$ . Ces effets ne sont pas identiques dans d'autres tissus où la T3 aurait tendance à diminuer légèrement l'expression de TR $\alpha_1$  (revue dans Yen, 2001).

Il apparaît donc que l'expression de certains types de récepteurs de l'AR et de la T3 dans la cellule est dépendante de la biodisponibilité de leurs métabolites actifs.

#### **II.4.2. Hétérodimérisation et hétérorégulation**

Le RXR joue un rôle central dans la régulation génique puisqu'il est considéré comme le partenaire commun de dimérisation avec d'autres membres de la superfamille (Bugge et al., 1992). Ce partenaire commun souligne l'importance du signal rétinoïde qui est placé au centre d'un réseau de signaux multihormonaux complexe. Ainsi, l'hétérodimérisation entre les récepteurs permet une hétérorégulation entre différentes voies hormonales. Les hétérodimères TR/RXR et RAR/RXR sont les principaux médiateurs de l'action transactivatrice de la T3 et de l'AR sur la transcription (Yen et al., 1992 ; revue dans Glass, 1994).

Des interactions existent aussi entre les récepteurs nucléaires et les voies de signalisation de second messenger cellulaire. A titre d'exemple, une synergie a été mise en évidence entre la voie de l'adénylate cyclase AMPc/PKA et les RAR, GR, ER VDR et TR (Leitman et al., 1996).

## **II.5.GENES REGULES PAR L'ACIDE RETINOÏQUE ET LA TRIIODOTHYRONINE**

### **II.5.1. Implication des rétinoïdes et des hormones thyroïdiennes dans le cerveau adulte**

La correspondance des sites d'expression de gènes contenant des éléments de réponse à l'AR, de récepteurs, de protéines de liaison et d'enzymes de métabolisation de l'AR, a pu être mise en évidence dans certaines régions du cerveau par Thompson Haskell et al. (2002). De plus, une corrélation existe entre la synthèse d'AR et la présence de RAR $\alpha$ ,  $\beta$  et RXR $\beta$ ,  $\gamma$  dans les neurones dopaminergiques du striatum (McCaffery et Dräger, 1994 ; Zetterström et al., 1999). Les récepteurs DR2 de la dopamine qui présentent un élément de réponse RARE dans le promoteur de leur gène (Samad et al., 1997) ont été impliqués dans les performances mnésiques (Bartres-Faz et al., 2002). Les rétinoïdes régulent également certains gènes qui codent pour des protéines impliquées dans la transmission cholinergique elle-même impliquée dans les processus mnésiques (Bartus, 2000 ; Okuma et al., 2000).

Parmi les autres gènes cibles de l'AR, on trouve celui 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 al., 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 (Baldelli et al., 2000 ; Brandner et al., 2000; Schinder et Poo, 2000 ; Ikegaya et al., 2002). D'autres gènes régulés par l'AR ont des rôles mieux définis dans la plasticité synaptique et les processus mnésiques: c'est le cas notamment du récepteur N-méthyl-D-aspartate (NMDA) (Beczowska et al., 1996 ; Malenka et Nicoll, 1999) et de la kinase Ca<sup>2+</sup>/CaM dépendante CaMKII (Soderling, 1993 ; Braun et Schulman, 1995 ; Chen et Kelly, 1996 ; Soderling et al., 2001). Enfin, d'autres gènes impliqués dans la plasticité synaptique et liés au signal calcique, tels que la neurogranine (RC3) et la neuromoduline (GAP43) feront plus particulièrement l'objet de notre étude.

Certains exemples de gènes régulés par l'AR sont représentés dans le **tableau IV**. Ces quelques exemples suffisent à montrer que l'AR joue un rôle physiologique essentiel dans le cerveau, en régulant son propre système de réponse et en modulant l'expression de gènes intervenant dans les mécanismes moléculaires de la plasticité synaptique qui sous-tendent les processus mnésiques (Malik et al., 2000).

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

Sigle	Dénomination	Régulation	Références
CRABPI	Protéine cytosolique de liaison de l'AR de type I	+	Leonard et al., 1995
CRABPII	Protéine cytosolique de liaison de l'AR de type II	+	Plum et Clagett-Dame, 1995
RAR $\alpha$	Récepteur nuc. $\alpha$ de l'AR	+	Wuarin et al., 1994
RAR $\beta$	Récepteur nuc. $\beta$ de l'AR	+	Yamagata et al., 1993
RXR $\alpha$	Récepteur nuc. $\alpha$ de l'acide 9- <i>cis</i> rétinoïque	+	Wan et al., 1994
RXR $\beta$	Récepteur nuc. $\beta$ de l'acide 9- <i>cis</i> rétinoïque	+	Jones et al., 1993
RXR $\gamma$	Récepteur nuc. $\gamma$ de l'acide 9- <i>cis</i> rétinoïque	-	Wan et al., 1994
TR $\beta_2$	Récepteur nuc. $\beta_2$ de la triiodothyronine	+	Jones et al., 1993
TSH	Thyrotropine (s.u. $\beta$ )	-	Breen et al., 1995
SMRT	Co-répresseur RAR et TR	+	Bernadini et al., 1997
GH	Hormone de croissance	+	Bedo et al., 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 al., 1997
NGF	Facteur de croissance nerveux	+	Wion et al., 1987
RNMDA	Récepteur du N-méthyl-D-aspartate	+	Beczowska et al., 1996
ChAT	Choline acétyl-transférase	+	Kobayashi et al., 1994
VACHT	Transporteur de l'acétyl-choline aux vésicules	+	Berse et Blusztajn, 1995
DR2	Récepteur à la dopamine	+	Farooqui, 1994
Calbindin D28K	Protéine de liaison du calcium	+	Wang et Christakos, 1995
RC3	Neurogranine	+	Iñiguez et al., 1994
P38	Synaptophysine	+	Gaetano et al., 1992
CaMKII	Calmoduline kinase II	+	Chen et Kelly, 1996
tTG	Transglutaminase tissulaire	+	Chiocca et al., 1989
GAP43	Neuromoduline	+	Encinas et al., 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 al., 2000

Il est aujourd'hui admis que les hormones thyroïdiennes sont essentielles à la maturation du cerveau (revue dans Bernal, 2002 ; Smith et al., 2002). La déficience en HT est critique pendant la période de développement, et conduit à l'apparition de nombreuses anomalies telles qu'une altération de la migration cellulaire, une maturation incomplète des neurones et des cellules gliales, une réduction du volume et de la taille de certaines cellules, une réduction de la densité des synapses et des déficits de myélinisation (Legrand, 1984 ; Dussault et Ruel, 1987 ; Porterfield et Hendrich, 1993 ; Pasquini et Adamo, 1994).

L'intervention des HT dans le fonctionnement du cerveau mature est moins bien documentée. La distribution spécifique des HT et de leurs récepteurs dans les régions cérébrales adultes suggère que ces molécules jouent des rôles fonctionnels essentiels (Bradley et al., 1989).

Le taux d'HT est très important dans le SNC (Obregon et al., 1978 ; Van doorn et al., 1983 ; Pinna et al., 1999 ; Broedel et al., 2003). Des données bibliographiques ont montré que la T3 pourrait agir directement en tant que neurotransmetteur dans le SNC (Mason et al., 1993 ; Dratman et Gordon, 1996) ou pourraient permettre leur libération (Mason et al., 1993 ; Vara et al., 2002). Les HT auraient aussi un rôle dans les relations entre les neurones et les cellules gliales qui sont d'une importance fondamentale dans l'organisation et le maintien de l'architecture du SNC (revue dans Gomes et al., 1999). Des études ont également montré que les HT peuvent modifier les processus qui médient la plasticité synaptique (Calza et al., 1997). En effet, l'hypothyroïdie chez le rat adulte s'accompagne de déficits mnésiques (Dugbartey, 1998), de l'inhibition de la potentialisation à long terme dans la région CA1 de l'hippocampe (Gerges et al., 2001), et affecte le développement des dendrites des cellules pyramidales du champ CA1 de l'hippocampe (Gould et al., 1990). D'autres auteurs révèlent que des souris mutantes présentant des récepteurs TR $\beta$  ne liant pas la T3 ou dont le gène TR $\alpha_1$  est délété, montrent respectivement des altérations de la mémoire spatiale ou des altérations comportementales liées à des modifications de la structure de l'hippocampe (Hashimoto et al., 2001 ; Guadaño-Ferraz et al., 2003).

Les dysfonctionnements thyroïdiens de l'individu adulte se manifestent par des troubles neurologiques et psychiques (Yiannakouris et Valcana, 1994 ; Constant et al., 2001 ; Fukui et al., 2001).

Malgré l'importance fondamentale des HT dans le développement et le maintien des fonctions du SNC, à ce jour, seuls quelques gènes ont pu être identifiés comme étant des

gènes cibles spécifiques de la T3 (revue dans König et Moura Neto, 2002). Le **tableau V** illustre quelques exemples de ces gènes cibles.

## **II.5.2. Gènes impliqués dans la plasticité synaptique**

### II.5.2.1. Données générales sur la plasticité synaptique

Les dendrites d'un neurone représentent autant de surfaces supplémentaires, à part le corps cellulaire lui-même, pour l'établissement de contacts avec d'autres neurones. Le nombre et la distribution de ces contacts peuvent être considérés comme un indicateur de la plasticité synaptique. En effet, la disposition des connexions neuronales chez l'adulte n'est pas figée dans une configuration définitive mais est susceptible, dans certaines limites, de modifications. Par exemple au cours de l'apprentissage, il y a émergence puis pousse des neurites (qui deviennent ensuite des dendrites) et formation de nouvelles synapses. C'est pourquoi, 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 électrophysiologiquement 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 (revue dans Malenka, 1994 ; Pasinelli et al., 1995). Ainsi l'induction d'une PLT se traduirait par 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. Pour ces raisons, ce phénomène est étudié pour mieux appréhender les processus neurobiologiques qui sous-tendent les processus mnésiques (revue dans Bliss et Collingridge, 1993). Par ailleurs, il s'agit d'un modèle cellulaire des modifications plastiques, qui est particulièrement étudié au niveau de la formation hippocampique car cette structure est particulièrement importante dans les processus d'apprentissage.

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

Sigle	Dénomination	Régulation	Références
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
DII	5'-désiodase de type II	-	Burmeister et al., 1997
RXR $\beta$	Récepteur nuc. $\beta$ de l'acide 9- <i>cis</i> rétinoïque	+	Mano et al., 1993
RXR $\gamma$	Récepteur nuc. $\gamma$ de l'acide 9- <i>cis</i> rétinoïque	+	Mano et al., 1993
CRABPI	Protéine cytosolique de liaison de l'AR de type I	-	Wei et al., 1997
RC3	Neurogranine	+	Iñiguez et al., 1993
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
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 kinase pituitaire	+	Ashizawa et al., 1992
Pcp2	Protéine 2 de cellules de Purkinje	+	Zou et al., 1994
	Cycline D2	+	Poguet et al., 2003
PC2	Glycoprotéine de pore nucléaire	+	Martel et al., 2002
rhes	Protéine <u>h</u> omologue de <u>R</u> as, <u>e</u> nrichie dans le <u>g</u> triatum	+	Vargiu et al., 2001
c-myc		-	Perez-Juste et al., 2000

### II.5.2.2. La transglutaminase tissulaire

La transglutaminase tissulaire appartient à un groupe d'enzymes  $\text{Ca}^{2+}$  dépendantes qui catalysent la polymérisation des protéines en formant des ponts entre les résidus "glutamine" et "lysine" (Folk, 1980 ; revue dans Chen et Mehta, 1999). Cette réaction est d'un grand intérêt physiologique puisque ces liaisons sont très stables. En effet, elles ne peuvent être rompues qu'après dégradation totale de la ou des chaînes polypeptidiques. Les transglutaminases représentent une famille d'enzymes, codées par des unités transcriptionnelles distinctes, qui comprend à la fois des membres extra- et intra-cellulaires.

L'intervention de la transglutaminase tissulaire (tTG) 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 la plasticité synaptique. Dans le cerveau, elle a été identifiée dans différentes structures telles que le cortex, le striatum et l'hippocampe. Elle est présente dans les neurones, au niveau des corps cellulaires, des axones et des dendrites. Largement distribuée dans les terminaisons présynaptiques (Maggio et al., 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 al., 2001 ; Singh et al., 2003). Au niveau de la plasticité synaptique, un premier travail montrait une augmentation de l'activité de la tTG au cours des phénomènes de potentialisation à long terme (Friedrich et al., 1991) ; les nouvelles liaisons covalentes créées joueraient un rôle dans le maintien du nouvel état physiologique lors de la PLT. Enfin, certaines 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 (Lesort et al., 2000 ; Violante et al. 2001 ; Citron et al., 2002 ; Kim et al., 2002 ; Selkoe, 2002).

Un autre intérêt d'utiliser la tTG dans notre étude est qu'elle est considérée comme un bon indicateur de l'action *in vivo* des rétinoïdes (Verma et al., 1992). En effet, un élément de réponse à l'AR a été mis en évidence dans le promoteur de son gène (Nagy et al., 1996).



### II.5.2.3. La neuromoduline

La neuromoduline ou GAP43 ("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, elle est présente dans les corps cellulaires et dans les dendrites de certains neurones (Gerendasy et Sutcliffe, 1997 ; Paradies et Steward, 1997). La distribution spatio-temporelle de GAP43 est en accord avec ses fonctions au cours du développement et de la maturation du SNC. GAP43 joue un rôle clé dans le contrôle de la croissance des axones (Piontek et al., 2002 ; Shen et al., 2002) et dans la régénération axonale chez l'adulte (Chen et al., 2001). Principalement exprimée dans les terminaisons pré-synaptiques, la forme phosphorylée de GAP43 serait impliquée dans la plasticité synaptique, notamment en affectant la libération de neurotransmetteurs (Benowitz et Routtenberg, 1997). Par ailleurs, sa phosphorylation augmente après induction de la PLT (Ramakers et al., 2000). D'autres travaux ont montré, chez des souris mutantes sur-exprimant GAP43, l'augmentation de la PLT dans des coupes d'hippocampe (Hulo et al., 2002). Il a aussi été montré une corrélation entre le niveau d'expression de GAP43 et les performances d'apprentissage (Routtenberg et al., 2000 ; Quattrone et al., 2001).

Enfin, d'autres données mettent en évidence une régulation de GAP43 par les rétinoïdes *in vitro* (Encinas et al., 2000 ; Anderson et al., 2001).

### II.5.2.4. La neurogranine

La neurogranine ou RC3 est une protéine de 7,4 kDa spécifique des neurones, substrat de la PKC (Shakravarty et al., 1999), fortement exprimée dans la densité post-synaptique des épines dendritiques (Watson et al., 1994). Les propriétés biochimiques, l'expression et la localisation de la neurogranine suggèrent que cette protéine puisse intervenir comme élément post-synaptique ayant un rôle majeur 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 al., 1997). D'autres auteurs ont montré que l'injection, dans des cellules d'hippocampe en culture, d'anticorps anti-RC3 abolissait le maintien de la PLT (Fedorov et al., 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 al., 2000).

L'intérêt particulier que nous portons à cette protéine est dû au fait que RC3 est soumise *in vivo* et *in vitro* à un réseau complexe de signaux impliquant l'AR et la T3. En effet, Iñiguez et al. (1994) ont mis en évidence un RARE et un GRE dans la séquence promotrice du gène RC3. La capacité des rétinoïdes à réguler l'expression de RC3 *in vivo* a été prouvée (Enderlin et al., 1997a ; Etchamendy et al., 2001). Déjà en 1993, Iñiguez et al. soupçonnaient l'intervention des HT dans la régulation de l'expression de RC3. C'est en 1997 que Guadaño-Ferraz apportent la preuve que l'hypothyroïdie affecte l'expression de RC3 et par la suite, Martinez de Arriétâ et al. (1999) identifient un TRE dans le premier intron du gène codant NRGN (homologue de RC3 chez l'homme).

### **III. INTERACTIONS DES VOIES DE SIGNALISATION DE L'ACIDE RETINOÏQUE ET DE LA TRIODOOTHYRONINE**

#### **III.1. INTERACTIONS METABOLIQUES**

Il est connu depuis longtemps que le statut en vitamine A influence la structure et le fonctionnement de la glande thyroïde. Ainsi, la carence vitaminique A entraîne une hypertrophie de la thyroïde chez la femelle du rat et, au contraire, une atrophie chez le mâle par dégénérescence épithéliale et folliculaire (Coplan et Sampson, 1935). Plus récemment, il a été montré que la déficience en vitamine A conduit à une altération de la thyroglobuline, vraisemblablement au niveau de sa maturation par suite d'une glycosylation défectueuse (Ingenbleek, 1983 ; Namba et al., 1993 ; Simon et al., 2002). A l'inverse, les HT ont une influence sur la biodisponibilité de la vitamine A. Elles faciliteraient l'absorption du  $\beta$ -carotène (Mitchell et al., 1966), son clivage en rétinol (Smith et Borchers, 1972) et la mise en réserve hépatique de la vitamine A (Bhat et Cama, 1978). L'hypothyroïdie est associée à une augmentation des niveaux plasmatiques de rétinol et  $\beta$ -carotène contrairement à l'état d'hyperthyroïdie où ils seraient diminués (Goswami et Choudhury, 1999 ; Mesaros-Kanjski et al., 1999).

Le complexe des protéines vectrices du rétinol et des HT, respectivement la RBP et la TTR, permet d'envisager un autre aspect des interactions vitamine A-HT. En effet, la répartition des HT sur leurs protéines vectrices est modifiée chez un rat carencé en vitamine A (Higueret et Garcin, 1979 ; Garcin et Higueret, 1980). Par ailleurs, cette situation de carence s'accompagne d'une augmentation du taux sérique des HT (Garcin et Higueret, 1977, 1980, 1983 ; Morley et al., 1980). Au contraire, ces taux diminuent quand les apports en vitamine A sont élevés (Morley et al., 1980 ; Garcin et al., 1984). De plus, l'AR serait capable d'inhiber la liaison de T4 à la TTR (Smith et al., 1994). Des souris dépourvues de TTR présentent des taux de rétinol sérique et de RBP diminués (van Bennekum et al., 2001). Les HT influencent également l'expression de certaines protéines de liaison des rétinoïdes comme la CRBP (Okuno et al., 1995) et la CRABP-I (Wei et al., 1997).

Une carence en vitamine A entraîne une diminution de l'activité désiodase des microsomes qui s'accompagne d'une baisse de la formation de T3 par le foie et les reins (Higueret et Garcin, 1982). Esfandiari et al. (1994) et Pallud et al. (1999) ont montré que les

rétinoïdes induisent l'activité de la désiodase de type III dans les cellules gliales. Cette action pourrait protéger certaines régions du cerveau des effets néfastes de la T3. De plus, la régulation de la synthèse et de la sécrétion de la TSH est sous le double contrôle des HT et de l'AR (revue dans Wolf, 2002) : l'AR serait capable d'inhiber la sécrétion de TSH *in vivo* (Coya et al., 1997) et *in vitro* (Breen et al., 1997 ; Brown et al., 2000 ; Laflamme et al., 2002 ; Macchia et al., 2002). Les HT contribuent également à la régulation des alcool-déshydrogénases (notamment l'ADH3 humaine) et à celle des aldéhydes-déshydrogénases *in vitro* et *in vivo* (Smith et Dawson, 1985 ; Harding et Duester, 1992 ; Zgombic et Duester, 1993 ; Zhou et Weiner, 1997).

### **III.2. INTERACTIONS NUCLEAIRES**

Les mécanismes moléculaires par lesquels les récepteurs nucléaires régulent l'expression de gènes peuvent faire intervenir des hétérodimérisations entre les récepteurs. L'hétérodimérisation des TR avec RXR est un carrefour où les voies de signalisation des rétinoides et des HT interagissent. Une étroite relation entre ces deux voies est illustrée par le fait que le RAR est génétiquement plus ressemblant au TR qu'au RXR. Les structures très proches des RAR et des TR indiquent leur capacité à se lier sur des HRE communs et à activer la transcription génique. Par ailleurs, RXR a été récemment identifié comme un partenaire non silencieux de dimérisation avec TR (Li et al., 2002). Le gène de l'hormone de croissance du rat est une parfaite illustration des relations existant entre les voies d'action des rétinoides et des HT puisque celui-ci est sous le double contrôle de l'AR et de la T3. 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).

De plus, une hétérorégulation entre ces deux voies de signalisation est révélée, par exemple au niveau des récepteurs TR $\alpha_1$  (Satyanarayana et al., 1994) et TR $\beta_2$  (Jones et al., 1993) qui sont régulés positivement par l'AR. Les HT quant à elles semblent contrôler les taux de RXR $\beta$  et RXR $\gamma$  (Mano et al., 1993). Dans l'hypophyse, RXR $\alpha$  régule l'expression de certains gènes et la sécrétion d'hormones (Segura et al., 2000). Par ailleurs, une carence en vitamine A entraîne, chez le rat, des altérations de la voie de T3 traduites notamment par une baisse de la liaison de la T3 aux TR (Higueret et al., 1992).

## **IV. LE VIEILLISSEMENT**

1999 fût l'année internationale de la personne âgée. Cette phrase résume à elle seule l'importance du "*successful ageing*" et la nécessité de mieux cerner les processus biologiques qui sont altérés au cours du vieillissement.

### **IV.1. DONNEES GENERALES SUR LES DIFFERENTS PROCESSUS LIES AU VIEILLISSEMENT**

#### **IV.1.1. Définition**

Les discussions sur le vieillissement nécessitent une définition satisfaisante du terme "vieillissement". Forette et al. (1996) ; Robert (1996) et Marty (1996) ont proposé que le vieillissement soit défini comme «la somme de modifications (altérations) anatomiques, histologiques et physiologiques, survenues au cours du temps, au sein des différents types cellulaires, dans les différents organes et systèmes». Le vieillissement est généralement caractérisé par (i) des changements dans la composition biochimique des tissus ; (ii) une diminution progressive des capacités physiologiques ; (iii) une perte régulière de la capacité d'adaptation de l'organisme aux conditions variables de l'environnement et (iv) une augmentation des prédispositions aux maladies et à la mort (revue dans Troen, 2003).

De nombreuses théories ont été élaborées pour tenter d'élucider les mécanismes du vieillissement. Parmi elles, on peut citer les théories évolutionnistes, descriptives, génétiques et environnementales. Les théories évolutionnistes étudient la longévité des différentes espèces animales en comparant leur manière de vieillir et en étudiant les altérations biologiques de l'organisme survenues en fonction de l'âge. Les théories descriptives quant à elles proposent que l'usure ("*wear and tear*") de différents tissus et organes soit la responsable universelle du vieillissement. Les théories génétiques impliquent qu'il existe un mécanisme de régulation génétique programmé dans le processus du vieillissement. Enfin, les théories environnementales sont basées sur l'étude de facteurs externes ou internes qui endommagent les cellules, désorganisent les tissus et induisent le vieillissement. Prises

ensembles, ces théories expliquent la plupart des phénomènes liés au vieillissement (Gavrilov et Gavrilova, 2001 ; Jansen-Dürr et Osiewacz, 2002 ; Partridge et Gems, 2002).

#### **IV.1.2. Le vieillissement cérébral**

Chez les personnes âgées, les altérations neurobiologiques ont depuis longtemps été considéré comme un élément majeur du vieillissement. Ceci résulte du fait que les personnes âgées présentent une capacité d'apprentissage réduite et qu'elles ont une forte tendance à l'oubli. Le cerveau occupe donc une place essentielle dans la recherche actuelle sur le vieillissement.

Des études récentes suggèrent que les changements cérébraux soient plus subtils que la simple perte neuronale, qui certes existe mais n'est pas généralisée (Morrison et Hof, 1997 ; revue dans Rutten et al., 2003). En fait, on peut décrire le vieillissement du cerveau à plusieurs niveaux d'organisation. A un niveau systémique, le vieillissement se manifeste par une diminution des facultés d'adaptation, une baisse des capacités mnésiques... (Erickson et Barnes, 2003). A un niveau anatomique, on peut observer une atrophie cérébrale et une dilatation ventriculaire ; ces modifications sont souvent hétérogènes selon les individus (Sullivan et al., 2001). Des altérations cérébrales majeures sont dues à la diminution de la densité de certains récepteurs ou de la production des neurotransmetteurs et à la démyélinisation des fibres nerveuses qui jouent un rôle fondamental dans la transmission des signaux (Perdigo, 1994 ; Wickelgren, 1996 ; Robert, 1998). Ces modifications morphologiques s'accompagnent d'altérations de la plasticité synaptique au cours du vieillissement.

Les différentes maladies neurodégénératives très souvent observées chez les personnes âgées résulteraient de la pluralité des mécanismes à l'origine de ces modifications neurobiologiques (Larrieu et al., 2004). La maladie d'Alzheimer, dont la fréquence augmente avec l'âge, est l'une des maladies dégénératives les plus étudiées (Unverzagt et al., 2001 ; Hänninen et al., 2002 ; revue dans Dugué et al., 2003).

## **IV.2. CONSEQUENCES SUR LES VOIES DE SIGNALISATION DE L'ACIDE RETINOÏQUE ET DE LA TRIODOTHYRONINE**

### **IV.2.1. Au niveau métabolique**

Les données générales concernant les conséquences du vieillissement sur le métabolisme de la vitamine A sont à ce jour plus descriptives qu'explicatives. Globalement, au cours du vieillissement, le métabolisme de la vitamine A est fortement perturbé et peut se caractériser par des concentrations élevées en vitamine A dans le foie (McLaren et al., 1979 ; Sundboom et Olson, 1984 ; van der Loo et al., 2004). Cette augmentation des stocks hépatiques provoquerait la mise en place de mécanismes physiologiques compensateurs (Hollander et Dadufalza, 1990) qui expliqueraient notamment la hausse du rétinol sérique observée, chez les personnes âgées, après un repas (Borel et al., 1998). Néanmoins, Mino et al. (1993) puis Ravaglia et al. (2000) n'ont pas trouvé de variations avec l'âge de la concentration en rétinol ou RBP plasmatique. Par ailleurs, l'activité hépatique de l'ARAT (Acyl-coA : Retinol Acyl Transferase ; enzyme responsable de l'estérification du rétinol en rétinyl esters) augmente avec l'âge et à l'inverse, l'activité de la REH (enzyme responsable de l'hydrolyse des rétinyl esters en rétinol) diminue (Mobarhan et al., 1991). Il en est de même pour l'expression de la CRBP et des cytochromes P450 qui diminuent avec l'âge (Dawson et al., 2000 ; Yamamoto et al., 2000). Enfin, la capacité de l'organisme âgé à mobiliser les réserves hépatiques de rétinol et à l'utiliser efficacement semble fortement endommagée (Azais-Braesco et al., 1995).

Les effets délétères du vieillissement sont également observés sur la régulation du système endocrinien. Mooradian (1993a,b) a décrit la diminution de la production de certaines hormones avec l'âge. La glande thyroïde est principalement concernée puisqu'un nombre important de réactions auto-immunes dirigées contre les HT et contre les tissus de la glande thyroïde sont observées chez les sujets âgés (Burroughs et Shenkman, 1982 ; Mariotti et al., 1998 ; Hollowell et al., 2002). Le vieillissement provoquerait en premier lieu une diminution de la dégradation des HT, puis une diminution de leur sécrétion par la mise en jeu de boucles de régulation négatives. La chronologie de ces changements permet de comprendre les résultats parfois différents obtenus lors du dosage des HT circulantes. En effet, la majorité des études indiquent que les niveaux de T3 sérique semblent être inversement corrélés à l'âge

(Erfurth et Hagmar, 1995 ; Monzani et al., 1996 ; Chakraborti et al., 1999) et varieraient selon le sexe (da Costa et al., 2001). Par contre, les résultats sur la T4 circulante indiquent des valeurs soit diminuées (Margarity et al., 1985 ; da Costa et al., 2001) soit augmentées ou inchangées (Monzani et al., 1996 ; Chakraborti et al., 1999 ; revue dans Smith et al., 2002 ; Elmlinger et al., 2003) au cours du vieillissement.

La diminution de la production de T3 résulterait de la réduction de l'activité 5'-désiodase qui assure la conversion de T4 en T3 (Corrêa da Costa et Rosenthal, 1996 ; Magri et al., 2002). Les variations de la sécrétion des HT traduiraient les atteintes du système hypothalamo-hypophysaire avec l'âge. En effet, la concentration hypothalamique de TRH serait diminuée avec l'âge (Fisher et al., 2000) alors que les résultats concernant la TSH varient selon les études. Ainsi, des données obtenues chez l'homme ou l'animal montrent que la concentration en TSH peut être diminuée (Monzani et al., 1996 ; Chakraborti et al., 1999 ; Magri et al., 2002 ; Elmlinger et al., 2003) ou au contraire augmentée (Ravaglia et al., 2000 ; da Costa et al., 2001 ; Hollowell et al., 2002) ou même inchangée avec l'âge (Corrêa da Costa et Rosenthal, 1996 ; da Costa et al., 2001).

L'hypothyroïdie subclinique est définie par une concentration élevée en TSH, malgré des niveaux sériques de T3 et T4 normaux. La prévalence de cette pathologie est de plus de 5 % dans la population générale, et de plus de 20 % chez les femmes de plus de 60 ans (Manciet et al., 1995 ; Canaris et al., 2000). C'est ainsi que l'on considère que la plupart des troubles thyroïdiens décrits chez les personnes âgées relèvent fréquemment d'un statut d'hypothyroïdie (Finucane et Anderson, 1995).

#### **IV.2.2. Au niveau nucléaire**

Les troubles métaboliques associés au vieillissement se traduiraient par une biodisponibilité réduite en ligand (AR et T3) et une baisse concomitante de l'activité des voies de signalisation des rétinoides et des HT.

Les résultats obtenus dans l'Unité de Nutrition et Signalisation Cellulaire ont montré une diminution de l'expression des RAR, RXR et TR avec l'âge. En effet, la capacité des récepteurs de l'AR et de la T3 est fortement diminuée dans le foie (Pallet et al., 1997) et le cerveau (DeNayer et al., 1991) de rats âgés. Dès 1985, Kvetny avait rapporté la diminution de la capacité de liaison des TR dans les cellules mononucléées du sang de sujets humains âgés. Enderlin et al. (1997a,b) décrivent que les taux des ARNm codant pour les RAR $\beta$ , RXR $\beta/\gamma$  et les TR $\alpha/\beta$  sont baissés dans les cerveaux de rat ou de souris âgé(e)s. Ainsi, la baisse du



nombre ou de l'affinité des TR au cours du vieillissement pourrait entraîner une réduction de la sensibilité des cellules cibles aux HT (DeNayer, 1991).

L'hypoexpression des récepteurs nucléaires de l'AR et de la T3 s'accompagnent d'une réduction de l'expression de leurs gènes cibles. Une réduction des ARNm codant pour la tTG et une baisse de son activité enzymatique ont été reportées dans le foie et le cerveau de souris et de rats âgé(e)s (Pallet et al., 1997 ; Enderlin et al., 1997a,b). L'expression de la neurogranine est également affectée au cours du vieillissement. La baisse de RC3 est observée dans le cerveau et plus particulièrement dans l'hippocampe et le cortex cérébral de souris âgées (Enderlin et al., 1997a ; Mons et al., 2001 ; Etchamendy et al., 2001). De même, une étude immuno-histo-chimique (Casoli et al., 2001) montre une baisse de l'expression de GAP43 chez des rats âgés.

L'administration d'AR a permis de "normaliser", chez l'animal âgé, l'expression des récepteurs nucléaires de l'AR et de la T3. En effet, le traitement par l'AR a restauré, chez les souris et les rats âgés, la capacité de liaison à l'équilibre des RAR et TR et les niveaux d'expression des RAR $\beta$ , RXR $\beta/\gamma$  et TR $\alpha/\beta$  dans le foie ou le cerveau, à un niveau comparable à celui mesuré chez des animaux jeunes ou adultes (Enderlin et al., 1997a,b ; Pallet et al., 1997).

#### **IV.2.3. Au niveau fonctionnel**

Les altérations des voies de signalisation au cours du vieillissement ont de graves conséquences fonctionnelles puisque certains gènes cibles de l'AR et de la T3, dont RC3 et GAP43, sont impliqués dans les phénomènes de plasticité synaptique qui sous-tendent les processus mnésiques (Fedorov et al., 1995 ; Pak et al., 2000 ; Marighetto et al., 2000). Un lien spécifique a été établi entre l'hypoexpression de la voie de signalisation des rétinoïdes et les troubles cognitifs. En effet, l'administration d'AR aux souris âgées corrige totalement et sélectivement les déficits mnésiques observés (Etchamendy et al., 2001). Par ailleurs, des travaux ultérieurs suggèrent l'intervention des rétinoïdes dans l'étiologie de la maladie d'Alzheimer (Goodman et Pardee, 2003). De nombreux gènes régulés par les rétinoïdes et codant pour des protéines impliquées dans les phénomènes de plasticité synaptique ou de survie cellulaire (récepteurs NMDA, NGF (Beczowska et al., 1996 ; Scheibe et Wagner, 1992)) voient leurs expressions diminuer avec l'âge.

La plupart des données de la littérature montrent que les désordres des fonctions thyroïdiennes observés chez les personnes âgées sont généralement associés à des troubles du

comportement et de l'humeur (revue dans Tremont et al., 2003). Selon certains auteurs le degré de déficit cognitif pourrait être associé aux niveaux de T4 sériques particulièrement chez les patients souffrant d'hypothyroïdie sévère ou subclinique. Chez des sujets euthyroïdiens âgés, il existerait une relation étroite entre les concentrations de T4 circulante et les performances cognitives (Jaeschke et al., 1996 ; Prinz et al., 1999). De plus, il existerait une corrélation négative entre le taux de TSH et le risque d'apparition de démence (Kalmijn et al., 2000).

L'ensemble des données présentées ci-dessus est en faveur d'une hypothèse selon laquelle un hypofonctionnement des voies des rétinoïdes et des HT générerait des altérations de la plasticité cérébrale qui participeraient au déclin des capacités mnésiques observé au cours du vieillissement.

### **IV.3. LE MODELE DE LA CARENCE EN VITAMINE A**

Afin de mieux comprendre le lien entre l'hypoexpression de la voie d'action des rétinoïdes et les troubles mnésiques, l'étude des conséquences fonctionnelles d'une diminution physiologique de la biodisponibilité en vitamine A s'est avérée nécessaire. Un modèle nutritionnel de carence en vitamine A, permettant la manipulation physiologique du niveau d'activité de la voie de signalisation de l'AR a été développé au laboratoire (Enderlin et al., 2000 ; Etchamendy et al., 2001).

Des souris reçues au sevrage ont été nourries avec un régime dépourvu de vitamine A pendant 35 semaines. Les dosages de rétinol sérique et de l'activité de la tTG hépatique montrent que la carence vitaminique A s'établit après 26 semaines de régime carencé. Ce nouvel état s'accompagne d'une baisse de l'activité de la voie de signalisation de l'AR qui, après 31 semaines de régime, se caractérise par une diminution du taux des ARNm codant pour les récepteurs RAR et RXR. Dans ces conditions, une administration d'AR (150  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{jour}$ ) pendant 4 jours aux animaux carencés ne s'accompagne d'aucun effet significatif sur l'activité de la voie d'action de l'AR. En revanche ce même traitement appliqué pendant 28 jours restaure l'expression des RAR et de la tTG.

Les résultats obtenus chez les souris carencées mettent en évidence que la carence vitaminique A s'accompagne aussi d'une baisse d'expression de RC3. Par ailleurs, une étude comportementale, réalisée au laboratoire de Neurosciences Cognitives, montre que seuls les animaux carencés qui présentent une baisse significative de l'expression de RC3 présentent

des déficits de mémoire relationnelle (à savoir les souris carencées pendant au moins 35 semaines). Cette diminution de l'expression de RC3, pourrait contribuer aux modifications de la plasticité synaptique qui sous-tendent le déclin des capacités mnésiques de l'animal carencé. L'administration d'AR à des souris carencées en vitamine A ne modifie pas significativement l'expression de la neurogranine. Ces résultats sont en accord avec ceux d'une étude comportementale qui révèlent que le déficit mnésique observé chez les souris carencées persiste après le traitement par l'acide rétinoïque (Etchamendy et al., 2003).

En résumé, l'induction d'une hypoactivité modérée de la voie d'action des rétinoïdes par une carence vitaminique A entraîne, chez l'animal adulte, un déficit mnésique similaire à celui observé chez la souris âgée. En revanche, contrairement à ce que nous avons obtenu chez l'animal âgé, l'administration d'AR à des souris soumises à une carence en vitamine A prolongée n'a pas provoqué la disparition des déficits de mémoire relationnelle (déclarative). Ces résultats confortent l'hypothèse qui suggère l'intervention des rétinoïdes dans les processus cognitifs mais, ils révèlent aussi chez l'animal carencé, les limites de l'efficacité du traitement par l'AR. L'objectif de ce travail de thèse sera notamment de mieux comprendre ce dernier point.



## ***OBJECTIFS DE LA THESE***



## **OBJECTIFS DE TRAVAIL**

Nous avons publié, en collaboration avec le laboratoire de Neurosciences Cognitives, la première démonstration d'une relation, chez l'animal âgé, entre le niveau d'activité de la voie de signalisation des rétinoïdes et une activité cognitive (Etchamendy et al., 2001). La correction d'un déficit de mémoire relationnelle chez des souris âgées traitées par l'AR suggère que ce déficit mnésique dépende, au moins en partie, d'une diminution de la biodisponibilité de l'AR, dont l'administration compensatrice permet au mécanisme neuronal impliqué de fonctionner de nouveau de façon satisfaisante.

Ainsi, il est possible d'envisager que certaines atteintes de la mémoire survenant avec l'âge ne relèvent pas de lésions cellulaires irréversibles mais appartiennent à une catégorie de modifications fonctionnelles générées par des modifications hormonales, associées au vieillissement non pathologique, et susceptibles d'être compensées par l'administration d'un "traitement" efficace.

Cette interprétation a été mise à l'épreuve dans une seconde approche visant à évaluer les conséquences fonctionnelles d'une hypoactivité des voies d'action de l'AR induite, chez l'animal adulte, par un régime alimentaire dépourvu en vitamine A. En effet, les résultats obtenus chez des souris carencées ont montré une baisse d'expression des récepteurs nucléaires de l'AR, de celle de certains gènes cibles et des déficits mnésiques comparables à ceux décrits chez l'animal âgé. D'une façon surprenante, l'administration d'AR aux souris carencées n'a permis qu'une restauration partielle de l'expression des gènes impliqués dans la plasticité synaptique et n'a pas eu l'effet correcteur attendu sur les déficits cognitifs des animaux.

Par conséquent, si nos données sont en faveur d'une intervention fondamentale des rétinoïdes dans les processus biologiques et cognitifs, il est fort probable que notre hypothèse devrait intégrer d'autres membres de la superfamille des récepteurs nucléaires qui agissent en synergie avec les rétinoïdes. C'est le cas notamment des HT qui présentent de nombreuses

relations fonctionnelles avec les rétinoïdes au cours de leur métabolisme et de leur action cellulaire.

Dans ce contexte, ce travail de thèse vise à répondre aux questions suivantes :

1. Quelles sont les répercussions de l'âge ou d'une carence vitaminique A sur l'activité des voies de signalisation de l'acide rétinoïque et de la triiodothyronine ?
2. La sous-expression chronique des récepteurs nucléaires de l'AR et de la T3 induit des réponses adaptatives. Jusqu'à quel stade de ces réponses et dans quelles conditions est-il encore possible de maintenir certaines capacités fonctionnelles ?

Au plan théorique, nos hypothèses sont cohérentes avec les données qui suggèrent que les gènes du développement (les rétinoïdes et les HT jouent des rôles essentiels dans le développement du système nerveux central) sont aussi impliqués dans la plasticité du cerveau adulte. C'est la raison pour laquelle certains auteurs évoquent l'idée selon laquelle des dérégulations, même faibles, du niveau d'expression des récepteurs nucléaires pourraient se trouver à l'origine de bien des maladies du système nerveux comme de son vieillissement (Goodman et Pardee, 2003).

La première partie de ce travail a été réalisée chez des animaux âgés et des animaux carencés en vitamine A. Les résultats ont montré l'influence cruciale du statut thyroïdien sur la fonctionnalité de l'AR. Ils ont fait l'objet de deux publications (**Chapitre II**) intitulées :

Publication 1 :

***Triiodothyronine administration reverses vitamin A deficiency-related hypo-expression of retinoic acid and triiodothyronine nuclear receptors and of neurogranin in rat brain***

*Husson et al. British Journal of Nutrition. 2003. 90, 191-98.*

Publication 2 :

***Differential effect of retinoic acid and triiodothyronine on the age-related hypo-expression of neurogranin in rat***

*Neurobiology of Aging, sous presse.*



Conformément aux orientations générales des recherches en nutrition et aux objectifs du laboratoire, nos hypothèses ont été éprouvées chez l'Homme (**Chapitre III**). Ainsi, la deuxième partie de notre travail a été réalisée chez des sujets âgés recrutés dans la cohorte épidémiologique dite des « 3 Cités ». Nous avons d'abord cherché à déterminer si le vieillissement s'accompagnait d'une baisse de l'activité des voies de signalisation de l'AR et de la T3. Dans ce but nous avons mesuré le niveau d'expression des récepteurs nucléaires de l'AR et de la T3 dans les cellules mononucléées du sang.

Une étude similaire, réalisée chez des sujets hypothyroïdiens, avait pour but d'étudier les conséquences de cet état sur l'activité des voies de signalisation de l'AR et de la T3. Les résultats de ces deux études biomédicales font l'objet de deux publications intitulées :

Publication 3 :

***Aging affects the retinoic acid and the triiodothyronine nuclear receptors mRNA expression in human peripheral blood mononuclear cells***

*Soumise au European Journal of Endocrinology.*

Publication 4 :

***Decreased expression of retinoid nuclear receptors (RAR $\alpha$  and RAR $\gamma$ ) mRNA determined by real-time quantitative RT-PCR in peripheral blood mononuclear cells of hypothyroid patients***

*Soumise au Journal of Molecular endocrinology*



**CHAPITRE II**  
***ETUDES EXPERIMENTALES***



## **CHAPITRE II : ETUDES EXPERIMENTALES**

### **I. ACTION CELLULAIRE DE L'ACIDE RETINOÏQUE ET DE LA TRIIODOTHYRONINE DANS LE CERVEAU DE RATS CARENCES EN VITAMINE A**

Une baisse d'activité de la voie de signalisation de l'AR résultant du vieillissement ou induite par une carence vitaminique A s'accompagne, dans les deux situations, d'atteintes neurobiologiques et de déficits mnésiques spécifiques. En revanche, la correction d'un déficit de mémoire relationnelle, mise en évidence chez les souris âgées après traitement par l'AR, n'a pas été possible chez les souris carencées soumises au même traitement.

Ainsi, les résultats précédemment obtenus, respectivement chez les souris âgées et chez les souris carencées en vitamine A, sont cohérents et confortent l'idée qu'un niveau optimum d'activité de la voie de signalisation des rétinoïdes est une condition nécessaire au bon déroulement de certains des processus neurobiologiques qui sous-tendent les fonctions cognitives. De plus, ces études soulignent que l'efficacité du traitement par l'AR ne semble pas dépendre seulement du niveau d'activité de sa propre voie de signalisation.

Pour étayer cette conclusion et établir la nécessité de prendre en compte les relations entre les récepteurs nucléaires, nous devons rappeler que la carence en vitamine A entraîne une baisse des récepteurs de l'AR mais aussi de ceux de la T3 (Higueret et Garcin, 1984 ; Higueret et al., 1989). Les relations entre ces deux types de récepteurs peuvent concerner différents aspects. A titre d'exemple, les données de la littérature indiquent que dans les cellules cibles de sujets hypothyroïdiens, les TR dépourvus de ligands forment des apo-récepteurs qui exercent une activité répressive sur l'expression des RAR (Sachs et al., 2002 ; Makowski et al., 2003).

Dans ce contexte, nous avons envisagé que l'altération de la voie d'action de la T3 pourrait contribuer à la perte de l'efficacité du traitement par l'AR chez les animaux carencés. Cette hypothèse a été éprouvée chez le rat. Dans cette étude, le changement de modèle animal se justifie par le fait que le rat développe une carence vitaminiq ue A beaucoup plus rapidement. En effet, alors que chez la souris, un état de carence s'établit après 26 semaines de régime dépourvu en vitamine A, chez le rat, 8 à 10 semaines de régime suffisent à provoquer le ralentissement de la croissance pondérale caractéristique de la mise en place de la carence (Garcin et Higuere t, 1983 ; Higuere t et al., 1989). Dans ce travail, seuls les aspects moléculaires et biochimiques ont été étudiés, puisque l'objectif était d'abord de mieux comprendre l'évolution des voies de signalisation de l'AR et de la T3 dans le cerveau des animaux carencés et de définir les conditions de leur réactivation.

Les résultats obtenus ont fait l'objet de **l'article 1** publié dans *British Journal of Nutrition* (Husson et al. 2003. 90, 191-98).

## **I.1. METHODOLOGIE UTILISEE**

Un groupe de jeunes rats a été divisé, dès le sevrage, en deux lots, témoins et "carencés", selon le régime alimentaire qui leur était fourni. Après 10 semaines de régime, les rats carencés présentaient un ralentissement de leur croissance pondérale et une diminution significative de leur taux de rétinol sérique. Parmi les rats carencés, certains ont été soumis à une administration d'AR et/ou de T3 (150 µg/kg d'AR et/ou de T3) quotidiennement pendant 4 jours. Nous avons utilisé les mêmes conditions de traitement que celles qui avaient permis la normalisation du niveau d'expression des récepteurs RARβ, RXRβ/γ, TRα/β, et RC3 chez les animaux âgés (Enderlin et al., 1997a, b).

Dans les cerveaux des 5 groupes d'animaux (témoins, carencés, carencés traités par l'AR et/ou la T3), nous avons mesuré l'expression des récepteurs nucléaires RARβ, RXRβ/γ et TRα/β, l'activité enzymatique de la transglutaminase tissulaire (tTG) ainsi que l'expression de la neurogranine (RC3).

## **I.2. PRINCIPAUX RESULTATS ET DISCUSSION PARTIELLE**

### Effet d'une carence vitaminique A sur les voies d'action de l'AR et de la T3

Les résultats obtenus montrent une baisse de l'activité de la voie d'action de l'AR chez les animaux carencés. En effet, nous avons observé une diminution du taux des ARNm des récepteurs nucléaires RAR $\beta$ , RXR $\beta/\gamma$  et des gènes cibles tTG et RC3. Ces résultats sont en accord avec ceux que nous avons déjà obtenus chez des souris âgées (Enderlin et al., 1997a).

De façon plus surprenante, la carence en vitamine A s'accompagne aussi de la baisse de l'activité de la voie de signalisation de la T3. En effet, nous avons mesuré une baisse de l'expression des TR $\alpha/\beta$  dans le cerveau des animaux carencés en vitamine A, ce qui suggère l'apparition d'un état "d'hypothyroïdie". Dans ce même ordre d'idée, des études épidémiologiques avaient déjà montré les conséquences d'une faible teneur en rétinol sérique sur l'apparition de goitre, assimilable à une déficience en iode (Ingenbleek et de Visscher, 1979). Au laboratoire, des études expérimentales avaient déjà révélé la diminution de l'expression des TR et la baisse de leur capacité de liaison dans le foie d'animaux carencés en vitamine A (Higueret et Garcin, 1984 ; Pailler-Rodde et al., 1991).

### Effet de l'administration d'AR ou de T3 à des animaux carencés en vitamine A

L'administration d'AR aux rats carencés restaure uniquement le niveau de ses propres récepteurs nucléaires (RAR $\beta$ , RXR $\beta/\gamma$ ) et, à l'inverse, ne corrige pas la baisse d'expression de RC3. Ces résultats sont en accord avec ceux que nous avons décrits chez des souris carencées en vitamine A (Etchamendy et al., 2003).

En revanche, l'administration de T3 rétablit l'expression de l'ensemble des récepteurs nucléaires (RAR $\beta$ , RXR $\beta/\gamma$  et TR $\alpha/\beta$ ) et de RC3 à un niveau comparable à celui mesuré chez les animaux témoins. Ces données montrent que les animaux carencés en vitamine A présentent des signes "d'hypothyroïdie cellulaire", caractérisée par une baisse de l'expression des récepteurs de la T3 et de RC3. Ainsi, il apparaît que l'action de l'AR sur la régulation de l'expression du gène RC3 est dépendante du niveau d'activité de la voie de signalisation des HT bien que ce gène possède un élément de réponse à l'AR dans son promoteur (Iñiguez et al., 1994).





**PUBLICATION 1**

**TRIIODOTHYRONINE ADMINISTRATION REVERSES  
VITAMIN A DEFICIENCY-RELATED HYPO-EXPRESSION  
OF RETINOIC ACID AND TRIIODOOTHYRONINE NUCLEAR  
RECEPTORS AND OF NEUROGRANIN IN RAT BRAIN**



## Triiodothyronine administration reverses vitamin A deficiency-related hypo-expression of retinoic acid and triiodothyronine nuclear receptors and of neurogranin in rat brain

Marianne Husson, Valérie Enderlin, Serge Alfos, Catherine Féart, Paul Higuieret and Véronique Pallet\*

Unité de Nutrition et Signalisation Cellulaire (E.A. MENRT; USC INRA) ISTAB, Université Bordeaux 1, Avenue des Facultés, 33405 Talence cedex, France

(Received 7 May 2002 – Revised 23 December 2002 – Accepted 10 February 2003)

Recent studies have revealed that retinoids play an important role in the adult central nervous system and cognitive functions. Previous investigations in mice have shown that vitamin A deficiency (VAD) generates a hypo-expression of retinoic acid (RA, the active metabolite of vitamin A) receptors and of neurogranin (RC3, a neuronal protein involved in synaptic plasticity) and a concomitant selective behavioural impairment. Knowing that RC3 is both a triiodothyronine ( $T_3$ ) and a RA target gene, and in consideration of the relationships between the signalling pathways of retinoids and thyroid hormones, the involvement of  $T_3$  on RA signalling functionality in VAD was investigated. Thus, the effects of vitamin A depletion and subsequent administration with RA and/or  $T_3$  on the expression of RA nuclear receptors (RAR, RXR),  $T_3$  nuclear receptor (TR) and on RC3 in the brain were examined. Rats fed a vitamin A-deficient diet for 10 weeks exhibited a decreased expression of RAR, RXR and TR mRNA and of RC3 mRNA and proteins. RA administration to these vitamin A-deficient rats reversed only the RA hypo-signalling in the brain. Interestingly,  $T_3$  is able to restore its own brain signalling simultaneously with that of vitamin A and the hypo-expression of RC3. These results obtained *in vivo* revealed that one of the consequences of VAD is a dysfunction in the thyroid signalling pathway in the brain. This seems of crucial importance since the down regulation of RC3 observed in the depleted rats was corrected only by  $T_3$ .

**Vitamin A deficiency: Retinoic acid nuclear receptors: Triiodothyronine nuclear receptors: Brain: Neurogranin**

Vitamin A and its derivatives (the retinoids) participate in many physiological processes including vision and reproduction (Sporn *et al.* 1994), and exert a wide variety of profound effects on vertebrate development, cellular differentiation and homeostasis (Chambon, 1996). In addition to the well-known and important role of retinoids and particularly retinoic acid (RA, the active metabolite of vitamin A) during the normal development of the central nervous system (Maden *et al.* 1998; Környei *et al.* 1999; Malik *et al.* 2000), various data suggest that retinoids play a significant role in the adult central nervous system. Initial investigations have shown that the adult brain: (i) is a retinoid-metabolizing tissue (McCaffery & Dräger, 1994; Connor & Sidell, 1997); (ii) contains cellular RA and retinol-binding protein as well as a high level of nuclear RA receptors (Krezel *et al.* 1999; Zetterström *et al.* 1999). The RA receptors, RAR (whose ligands are the all-*trans*-RA and 9-*cis*-RA isomers) and RXR (whose ligand is the 9-*cis*-RA isomer), are DNA-binding proteins which, upon

activation by specific retinoid ligands, induce gene transcription by interacting with distinct promoter sequences in the target genes (Kastner *et al.* 1995). Therefore, changes at the retinoid level are capable of producing alterations in several neuronal target proteins and consequently may affect physiological process maintenance in the mature brain (Malik *et al.* 2000). Indeed, knockout mice for RAR $\beta$  and RAR $\beta$ -RXR $\gamma$  display an alteration of long-term potentiation (the most widely studied form of synaptic plasticity, thought to underlie memory formation), as well as substantial performance deficits in a hippocampal-dependent spatial learning task (Chiang *et al.* 1998). A similar conclusion can also be drawn from recent studies using mice or rats receiving a postnatally induced vitamin A-deficient diet (Misner *et al.* 2001; Cocco *et al.* 2002). Moreover, our recent studies have shown that a moderate down regulation of retinoid-mediated transcription events naturally occurs with senescence (Enderlin *et al.* 1997). An administration of RA

**Abbreviations:** GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; PCR, polymerase chain reaction; RA, retinoic acid; RAR, retinoic acid receptor; RC3, neurogranin; RXR, retinoid X receptor;  $T_3$ , triiodothyronine; TR, triiodothyronine nuclear receptor; tTG, tissue-type transglutaminase; VAD, vitamin A deficiency.

\* **Corresponding author:** Dr Véronique Pallet, fax +33 5 56 84 27 76, email v.pallet@istab.u-bordeaux1.fr

restores to pre-senescent levels the age-related decrease in brain expression of its own receptors and of neurogranin (RC3), a specific associated target gene (Iñiguez *et al.* 1994; Enderlin *et al.* 1997) involved in synaptic plasticity (Gerendasy & Sutcliffe, 1997; Pak *et al.* 2000), and concomitantly alleviates both the relational memory and hippocampal long-term potentiation seen in aged mice (Etchamendy *et al.* 2001). Together these data suggest that a fine regulation of retinoid-mediated gene expression is fundamentally important for optimal brain functioning.

A previous study, obtained in our laboratory using a murine model, has evidenced that vitamin A deficiency (VAD) leads to a reduced expression of brain retinoid nuclear receptors and that of RC3 as well as selective behavioural impairment (Etchamendy *et al.* 2000). Surprisingly, RA administration to these animals failed to fully normalize the expression of the genes studied and had no effect on the associated cognitive deficit. It is well known that the activity field and signalling pathway of retinoids and thyroid hormones, whose active metabolite is triiodothyronine ( $T_3$ ), are in close relationship (Schröder & Carlberg, 1994; Chin & Yen, 1997). Moreover, alterations of thyroid hormone metabolism and functionality associated with VAD have been described (Ingenbleek & De Visscher, 1979; Okamura *et al.* 1981; Higuere & Garcin, 1984). Finally, RC3 is not only under the influence of retinoids (Iñiguez *et al.* 1994), but is regulated by thyroid hormone too (Guadaño-Ferraz *et al.* 1997; Morte *et al.* 1997; Martinez de Arrieta *et al.* 1999).

Thus, in the present work, the question arose regarding the possible implication of thyroid disorders in RA impairment in restoring neurological alterations to normal. Therefore, an examination was made first of the consequences of a vitamin A-deprived diet on  $T_3$  and RA nuclear receptors expression (TR, RAR and RXR, respectively), and on two of their target genes, RC3, and tissue-type transglutaminase (tTG); the tTG is a protein whose expression is highly regulated by RAR (Chiocca *et al.* 1989) and is considered as a biological marker of early VAD (Savouré *et al.* 1996). Second, the effect of administration of RA and/or  $T_3$  in vitamin A-deficient animals was studied.

## Materials and methods

### Experimental design

The study was conducted in accordance with the European Communities Council Directives (861609/EEC). All the experiments conformed to the Guidelines on the Handling and Training of Laboratory Animals. The experimental design of postnatal VAD was according to Audouin-Chevallier *et al.* (1993). Weaning male Wistar rats were purchased from Harlan (Gannat, France). They were maintained in a room with a constant airflow system, controlled temperature (21–23°C) and a 12 h light–dark cycle. The rats were allowed to have *ad libitum* access to food and tap water and were divided into two experimental groups: vitamin A-deficient (forty-eight animals); control (twelve animals). The vitamin A-deficient diet was composed as indicated in Table 1; the control diet was the same plus vitamin A (1515.15 RE/kg diet).

**Table 1.** Composition of the diet\*

Ingredients	Amount (g/kg)
Vitamin-free casein†	180
Sucrose	305
Peanut oil	25
Rapeseed oil	25
Cellulose	20
Maize starch	400
Mineral mixture‡	35
Vitamin mixture§	10

\*Vitamin A-sufficient diet according to Audouin-Chevallier *et al.* (1993). Chow was stored in sealed bags at 20°C and conserved after opening for a maximum of 1 week at 4°C.

†Vitamin-free casein from Touzard et Matignon, France.

‡Mineral mixture no. 102 from INRA (Jouy en Josas, France) consisted of the following (g/kg chow): calcium phosphate dibasic, 500; sodium chloride, 74; potassium monohydrate citrate, 220; magnesium sulfate, 52; magnesium oxide, 24; manganous carbonate (430–480 g Mn/kg manganous carbonate), 3.5; iron citrate (160–170 g Fe/kg iron citrate), 6; zinc carbonate (700 g zinc oxide/kg zinc carbonate), 1.6; copper carbonate (530–550 g Cu/kg copper carbonate), 0.3; potassium iodate, 0.01; sodium selenite (456.5 g Se/kg sodium selenite), 0.022; potassium and chromium sulfate, 0.55; sucrose to make up to 1 kg.

§Vitamin Diet Fortification Mixture without vitamin A no. 102 from INRA (Jouy en Josas, France) consisted of the following (g/kg chow): thiamine HCl, 0.6; riboflavin, 0.6; pyridoxine HCl, 3.0; D-calcium pantothenate, 1.6; folic acid, 0.2; D-biotin, 0.02; cyanocobalamin, 0.01; cholecalciferol, 0.00625; all-*rac*- $\alpha$ -tocopherol, 5; menadione, 0.05; ascorbic acid, 0.45; sucrose to make up to 1 kg.

Animals were fed these diets for 10 weeks. No difference between the different groups of rats was observed concerning the amount of food intake. At the time when the growth of the deficient animals slowed down, before weight reached a plateau and before the onset of apparent diseases was noted (these characteristics have previously been noted in the laboratory; Higuere & Garcin, 1982), some of depleted rats were injected daily (150  $\mu$ g/kg body weight) for 4 d with RA (all-*trans*-RA, Sigma St Quentin Fallavier, France, no. R2625; ) and/or  $T_3$  (Sigma no. T2752) or vehicle only. Twelve rats were used for each treatment. Control rats were administered with vehicle. The RA and  $T_3$  were dissolved in a mixture (vehicle) containing polyethyleneglycol–NaCl–ethanol (70:20:10, by vol.). Rats were killed by decapitation. The brain and the liver were rapidly removed, weighed and stored at –80°C for subsequent analysis. Brains and livers of the different groups exhibited no weight differences.

### Quantification of mRNA

Extraction of RNA was performed according to Chomczynski & Sacchi (1987).

### 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  $\mu$ g 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 polymerase chain reaction (PCR) was carried out using a LightCycler system (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), which combines the processes of amplification and detection (by fluorescence) of a PCR product, thereby enabling on-line and real-time detection. 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 µl containing 1X LC-DNA Master SYBR Green I mix, 4 mM-MgCl<sub>2</sub>, 0.5 µM of each primer and 2 µl 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 2. 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, Mannheim, Germany). 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 *v.* the amount of initial cDNA used for amplification. Standard curves were generated from 4-fold serial dilutions of target and housekeeping (glyceraldehyde 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.

#### Western blot analysis

Western blot analysis was performed according to the procedure of Watson *et al.* (1990) with minor modifications. Brain tissue from the control rats, the deficient rats and deficient rats treated with RA and/or T<sub>3</sub> was homogenized in 0.16 M-NaCl, 11 mM-sodium phosphate, pH 7.4. Just before homogenisation, 1.5 µM-PMSF was added. The homogenate was then 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 polyclonal rabbit anti-neurogranin antibodies (diluted 1:3000, Affinity Research Product, Le Perray en Yvelines, France, no. NA 1300) or monoclonal mouse anti-β-actin antibodies (1:8000; Sigma no. A-5441), and washed briefly with PBS-Tween 20 buffer. Immunoreactive polypeptide bands were visualized enzymically in a secondary antibody reaction using alkaline phosphatase-conjugated anti-rabbit (Sigma no. A-0545) or anti-mouse immunoglobulin G (Amersham, Orsay, France, no. Na 93; ). The staining intensity of protein bands was determined using an image analyser (Bio 1D; Vilbert Lourmat, Marne La Vallée, France). The relative levels of RC3 and β-actin proteins were determined as a percentage of the RC3 and β-actin in control rats.

**Table 2.** Primers used for LightCycler™ real-time polymerase chain reaction (PCR) with sequences forward (F) and reverse (R) primers, and size of amplicon

PCR primer pair	Ref.	Sequence	Position	Product length (bp)
GAPDH	Sabath <i>et al.</i> (1990)*	F: 5-GAACATCATCCCTGCATCCA-3 R: 5-CCAGTGAGCTTCCCCTTCA-3	1455–1474 1532–1514	78
RARβ	Zelent <i>et al.</i> (1989)†	F: 5-CAGCTGGGTAAATACACCACGAA-3 R: 5-GGGGTATACCTGGTACAAATTCTGA-3	786–808 1012–988	227
RXRβ/γ	Mangelsdorf <i>et al.</i> (1992)‡	F: 5-AGGCAGGTTTGCCAAGCTTCTG-3 R: 5-GGAGTGTCTCCAATGAGCTTGA-3	1361–1382 1462–1441	102
TRα/β	Murray <i>et al.</i> (1988)§	F: 5-TCCTGATGAAGGTGACGGACCTGC-3 R: 5-TCAAAGACTTCCAAGAAGAGAGGC-3	1247–1270 1364–1341	118
RC3	Watson <i>et al.</i> (1990)	F: 5-GCTCCAAGCCAGACGACGATATTC-3 R: 5-CTTCTTCTATTCTCGCCTCTCAC-3	29–53 152–128	127

GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; RAR, retinoic acid receptor; RXR, retinoid X receptor; TR, triiodothyronine receptor; RC, neurogranin.

\* From murine GAPDH cDNA.

† From murine RARβ cDNA.

‡ From murine RXRβ cDNA.

§ From rat TRβ cDNA.

|| From rodent RC3 cDNA.

### Assay for tissue transglutaminase activity

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

### Serum retinol assay

Serum retinol was assayed by HPLC according to the method of Leclercq & Bourgeay-Causse (1981).

### Liver retinol and retinyl palmitate assay

Liver retinol and retinyl palmitate were assayed by HPLC according to the method of Savouré *et al.* (1996).

### Proteins

Proteins were determined according to Bradford (1976) using a Bio-Rad protein assay (Bio-Rad Laboratories, Munich, Germany).

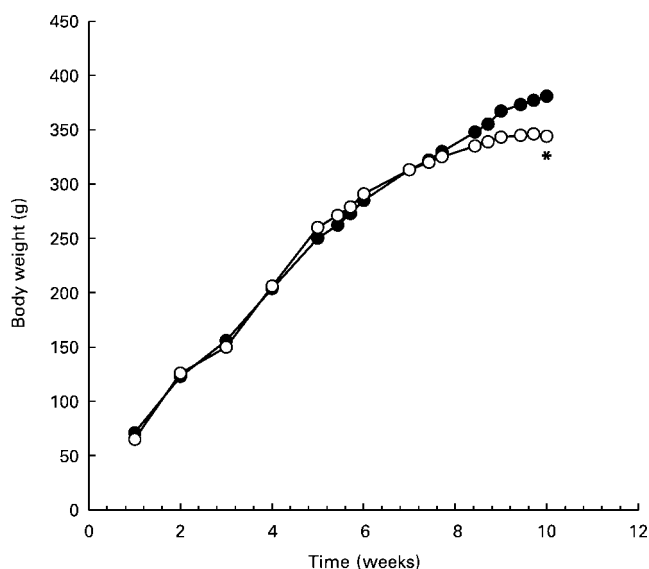
### Statistical analysis

Values are given as means and standard errors of the mean. The statistical significance of differences between means was calculated by ANOVA followed by Student's *t* test ( $P < 0.05$ ) using Minitab Statistical Software (State College, PA, USA).

## Results

### Growth curve

Fig. 1 shows the effects of vitamin A-depleted diet consumption during 10 weeks in vitamin A-deficient and control rats. After 10 weeks the body weight of



**Fig. 1.** Effect of 10 weeks consumption of vitamin A-depleted diet on body weight. Each point is the mean for twelve rats. (—●—), control rats; (—○—), depleted rats. \*Mean value was significantly different from that of the control animals.

vitamin A-deficient rats was significantly lower than that of control. The average difference between body weights of the two groups after 10 weeks was 36.35 g.

### Effect of vitamin A deficiency on liver retinol and retinyl palmitate

The liver retinyl palmitate and retinol concentrations were measured in control and depleted rats. Retinyl palmitate appeared nearly undetectable in vitamin A-deficient rat liver ( $< 1$  v. 355 (SEM 29) nmoles/g liver in control rats) after 10 weeks of depleted diet consumption. On the other hand, liver retinol concentrations were 67% lower than in control animals (5.9 (SEM 1.8) v. 18.0 (SEM 2.3) nmoles/g liver).

### Effect of vitamin A deficiency on serum retinol and triiodothyronine

Serum retinol concentration was significantly diminished by VAD (0.31 (SEM 0.03) v. 1.31 (SEM 0.10)  $\mu$ mol/l in depleted and control rats, respectively). In contrast, T<sub>3</sub> serum levels were unchanged in deficient animals compared with controls (1.06 (SEM 0.11) v. 1.01 (SEM 0.07) nmol/l in depleted and control rats, respectively). Data are for the measures performed on six animals.

### Effect of vitamin A deficiency on nuclear receptors and target genes

The results are summarized in Tables 3 and 4.

### Effect on all-trans-retinoic acid nuclear receptor, retinoid X receptor and tissue transglutaminase

In accordance with our previous results obtained in the brain of vitamin A-depleted mice (Enderlin *et al.* 2000), the expression of RAR $\beta$ , RXR  $\beta/\gamma$  and the activity of tTG decreased in the rat brain after 10 weeks of the depleted diet. Indeed, in these rats, the amounts of RAR $\beta$  and RXR $\beta/\gamma$  mRNA were lower (–36 and –24%, respectively) than in the brain of control rats (Table 3). Simultaneously, a significantly reduced tTG activity (–35%) was observed (234 (SEM 20) v. 362

**Table 3.** Influence of vitamin A-deficient diet on the abundance of retinoic acid (RAR $\beta$ ) and triiodothyronine (TR $\alpha/\beta$ ) nuclear receptor (RXR $\beta/\gamma$ ) mRNA in rat brain†

(Mean values and standard errors of the mean for six animals)

	mRNA (% GAPDH)					
	RAR $\beta$		RXR $\beta/\gamma$		TR $\alpha/\beta$	
	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM
Controls	0.150	0.010	0.920	0.046	7.96	0.48
Depleted	0.096*	0.009	0.700*	0.035	5.55*	0.36

GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; RAR, retinoic acid receptor; RXR, retinoid X receptor; TR, triiodothyronine nuclear receptor.

\*Mean values were significantly different from those of the control animals ( $P < 0.05$ ). (ANOVA followed by Student's *t* test).

† For details of diet and procedures, see Table 1 and pp. 192–193.

**Table 4.** Influence of vitamin A deficiency on the abundance of neurogranin mRNA and protein in rat brain† (Mean values and standard errors of the mean for six animals)

	Neurogranin			
	mRNA (% GAPDH)		Protein (% controls)	
	Mean	SEM	Mean	SEM
Controls	102	6	100	5
Depleted	74*	4	63*	3

GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

\*Mean values were significantly different from those of the control animals ( $P < 0.05$ ) (ANOVA followed by Student's *t* test).

† For details of diet and procedures, see, Table 1 and pp. 192–193.

(SEM 20) fmol/h per mg protein in depleted and control rats, respectively).

#### Effect on triiodothyronine nuclear receptor

Together with a reduced expression of RAR $\beta$  and RXR $\beta/\gamma$ , VAD led to a decrease in TR $\alpha/\beta$  mRNA of about 30% (Table 3). This decrease had previously been shown only in the liver of depleted rats (Pailler-Rodde *et al.* 1991).

#### Effect on neurogranin

The VAD was accompanied by an alteration in the expression of RC3, a T<sub>3</sub> and RA target gene. Indeed, in depleted rats, a reduced expression of mRNA and protein (–27 and –37%, respectively) was observed (Table 4). In contrast, immunoblots of depleted and control homogenized brains with  $\beta$ -actin antibody (detected as a single band migrating at 42 kDa) revealed no differences of intensity between these two groups. The results concerning RC3 were in agreement with previous results showing a similar decrease in depleted mice (Etchamendy *et al.* 2000).

#### Effect of retinoic acid and/or triiodothyronine administration on nuclear receptors and target genes

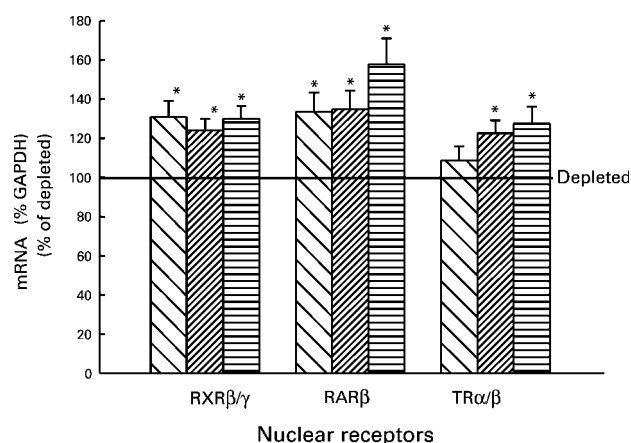
The results are summarized in Figs. 2, 3 and 4.

#### Effect on retinoic acid receptor, retinoid X receptor and tissue-type transglutaminase

Following RA and/or T<sub>3</sub> administration in vitamin A-depleted rats, increased amounts of RAR $\beta$  (+34% with RA, +35% with T<sub>3</sub> and +57% with RA and T<sub>3</sub>) and RXR $\beta/\gamma$  (+31% with RA, +24% with T<sub>3</sub> and +30% with RA and T<sub>3</sub>) mRNA were observed (Fig. 2). This also led to an increase in tTG activity of about 85% with RA, 50% with T<sub>3</sub> and 90% with RA and T<sub>3</sub> (Fig. 3).

#### Effect on triiodothyronine nuclear receptor

In vitamin A-deficient rats, the abundance of TR $\alpha/\beta$  mRNA was unchanged after administration of RA. On the other hand, an increase in mRNA level after administration



**Fig. 2.** Effect of retinoic acid (RA) and/or triiodothyronine (T<sub>3</sub>) administration (150  $\mu$ g/kg body weight per d for 4 d) on retinoid X receptor (RXR $\beta/\gamma$ ), retinoic acid receptor (RAR $\beta$ ) and triiodothyronine receptor (TR $\alpha/\beta$ ) mRNA levels in the brain of vitamin A-deficient rats. Data represent the mean values of the measures performed on six animals with the standard errors of the mean represented by vertical bars. \*Mean value was significantly different from that of depleted animals ( $P < 0.05$ ). Data were analysed using ANOVA followed by Student's *t* test. (▨), depleted + RA; (▩), depleted + T<sub>3</sub>; (▧), depleted + RA + T<sub>3</sub>; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

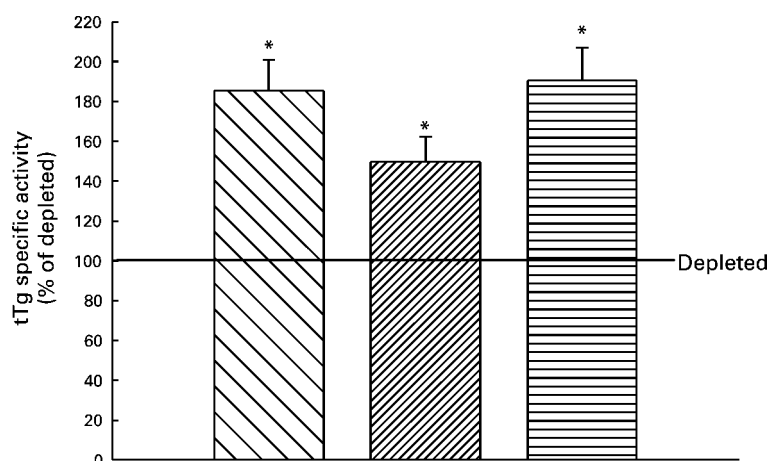
of T<sub>3</sub> with or without RA of about 27 and 23%, respectively, was observed (Fig. 2).

#### Effect on neurogranin

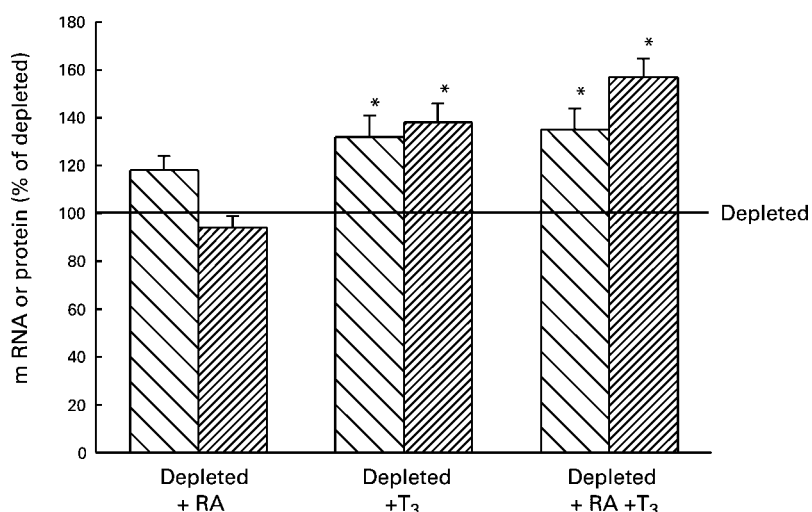
Concerning RC3, the administration of T<sub>3</sub> with or without RA increased RC3 mRNA (+35 and +32%, respectively) and protein (+131 and +38%, respectively) abundance, whereas no change was observed after administration of RA (Fig. 4). Moreover, immunoblots revealed no treatment-related differences between groups concerning the intensity of  $\beta$ -actin.

## Discussion

Our data showed that rats fed a vitamin A-deprived diet exhibited a hypo-activity of the retinoid signalling pathway, characterized by a decreased amount of RAR $\beta$  and RXR $\beta/\gamma$  mRNA and tTG activity in the brain with respect to control rats. Comparable results have already been obtained in the rat brain (Verma *et al.* 1992; Yagamata *et al.* 1993), and recently in vitamin A-deficient mouse brain (Enderlin *et al.* 2000). The present study also revealed that VAD impaired the cellular action of T<sub>3</sub> with consequences in the brain. Indeed, it provides the first evidence for a decreased expression of the TR mRNA in vitamin A-depleted rat brain, and, as previously observed in mice (Etchamendy *et al.* 2000), a hypo-expression of the amount of mRNA as well as of proteins of RC3 which is a T<sub>3</sub> target gene. These results were coherent with data obtained in vitamin A-deficient rat liver, which have revealed a decreased transport of T<sub>3</sub> into target cells (Higueret & Garcin, 1984; Pailler-Rodde *et al.* 1991). Besides, in the present work, the cellular activity



**Fig. 3.** Effect of retinoic acid (RA) and/or triiodothyronine (T<sub>3</sub>) administration (150 µg/kg body weight per d for 4 d) on tissue-type transglutaminase activity in the brain of vitamin A-deficient rats. Data represent the mean values of the measures performed on six animals, with the standard errors of the mean represented by vertical bars. \*Mean value was significantly different from that of depleted animals ( $P < 0.05$ ). Data were analysed using ANOVA followed by Student's *t* test. (▨), depleted + RA; (▩), depleted + T<sub>3</sub>; (▧) depleted + RA + T<sub>3</sub>.



**Fig. 4.** Effect of retinoic acid (RA) and/or triiodothyronine (T<sub>3</sub>) administration (150 µg/kg body weight per d for 4 d) on neurogranin mRNA (▨) and protein (▩) levels in the brain of vitamin A-deficient rats. Data represent the mean values of the measures performed on six animals, with the standard errors of the mean represented by vertical bars. \*Mean value was significantly different from that of depleted animals ( $P < 0.05$ ). Data were analysed using ANOVA followed by Student's *t* test.

of malic enzyme, which is controlled by T<sub>3</sub> in rat liver, kidney and heart (Jeannin *et al.* 1998) was decreased by about 50% in vitamin A-deficient rat liver (data not shown) indicating that the cellular action of T<sub>3</sub> is decreased in vitamin A-deficient rats. Thus, the decreased amount of TR mRNA observed in depleted rats would be, indeed, the result of a decreased T<sub>3</sub> cellular bioavailability.

Present data are coherent with several findings which revive the concept of permanent interactions between thyroid hormone and vitamin A metabolisms. For example: (i) epidemiological data suggest that low serum retinol levels favour the appearance of goitrous disease in a manner comparable to I deprivation (Ingenbleek & De Visscher, 1979); (ii) the enhancement of retinoid pathways seems to depend on the secretory rate of transthyretin (which conveys thyroid hormone) (Ingenbleek & Bernstein, 1999). Moreover, previous study has revealed

that the modulation of the binding properties of RAR as well as of TR by RA was dependent on thyroid status (Pallet *et al.* 1994).

As observed in vitamin A-deficient mice, the reactivation by RA treatment of its own signalling (auto-regulation) was demonstrated in depleted rats by a normalization of the expression of brain receptor (RARβ and RXRβ/γ) and tTG activity. Nevertheless, whereas in rats that are not vitamin A-deficient, RA is able to up regulate RC3 (Enderlin *et al.* 1997; Etchamendy *et al.* 2001), in vitamin A-deficient rats the administration of RA failed to normalize the expression of RC3 as well as of TR. Thus, to evaluate the involvement of T<sub>3</sub> on RA signalling in depleted rats, RA administration was compared with T<sub>3</sub> administration or T<sub>3</sub> and RA co-administration. Interestingly, the results showed that the administration of T<sub>3</sub> alone is able to reverse its own brain hypo-signalling



(auto-regulation) simultaneously with that of RA (hetero-regulation) and the hypo-expression of RC3 mRNA and proteins. Moreover, our experiments revealed a synergetic effect of RA and T<sub>3</sub>, first on the mRNA expression of RAR which increased by about 35 % and 57 % after either T<sub>3</sub> or T<sub>3</sub> + RA administration, respectively, and second, on the protein expression of RC3. Therefore, the regulation of RC3 by RA in VAD is dependent on T<sub>3</sub> levels in spite of a RA-responsive element in the RC3 gene promoter.

Our results indicate that one of the consequences of VAD is a dysfunction in the thyroid signalling pathway in the brain. This seems of crucial importance since the down regulation of RC3 observed in the depleted rats was corrected only by T<sub>3</sub>. It seems that in vitamin A-deficient rats, hypo-activity of T<sub>3</sub> signalling becomes a limiting factor, which impairs RA from exerting its modulator effect. In comparison with previous works in depleted mice, showing that a sufficient level of vitamin A was required for the maintenance of mature brain function, the novel finding here is that vitamin A seems effective through the preservation of the integrity of the T<sub>3</sub> signalling.

Vitamin A deficiency seems to be associated with integrative and probably adaptive processes, suggesting that many physiological functions, at least vitamin A and T<sub>3</sub> signalling, are mobilized and become stabilized at new levels far from homeostatic equilibrium. In our opinion, this situation corresponds to the allostatic state described by Sterling & Eyer (1988) where the organism resets the parameters of its physiological systems at a new set point, and matches them appropriately to the chronic lack of vitamin A. If the lack continued, the allostatic maladaptation would lead to breakdown (neurobiological disorders) and illness.

More generally our results suggest that vitamin A-depleted animals develop signs of cellular hypothyroidism, since rats exhibit thyroid disorders characterized by alterations of the brain T<sub>3</sub> signalling and related target-gene hypo-expression which is reversed only by T<sub>3</sub> administration. Given the VAD-related neurological alterations, further investigation would provide insights into VAD management, a public health problem in many areas of the world, according to its severity.

### Acknowledgements

This research was supported by the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) and by the Conseil Régional d'Aquitaine.

### 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.

Audouin-Chevallier I, Higuieret P, Pallet V, Higuieret D & Garcin H (1993) Dietary vitamin A modulates the properties of retinoic acid and glucocorticoid receptors in rat liver. *Am Inst Nutr* **123**, 1195–1202.

Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for a quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248–254.

Chambon P (1996) A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J* **10**, 940–954.

Chiang MY, Misner D & Kempermann G, *et al.* (1998) An essential role for retinoid receptors RAR $\beta$  and RXR $\gamma$  in long-term potentiation and depression. *Neuron* **21**, 1353–1361.

Chin WW & Yen PM (1997) Molecular mechanisms of nuclear thyroid hormone action. In *Contemporary Endocrinology: Diseases of the Thyroid*, pp. 1–10 [LE Braverman Humana, editor]. Totowa, NJ: Press Inc..

Chiocca EA, Davies PJ & Stein JP (1989) Regulation of tissue transglutaminase gene expression as a molecular model for retinoid effects on proliferation and differentiation. *J Cell Biochem* **39**, 293–304.

Chomczynski P & Sacchi N (1987) Single step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Mol Biochem* **162**, 156–159.

Cocco S, Diaz G & Stancampiano R, *et al.* (2002) Vitamin A deficiency produces spatial learning and memory impairment in rats. *Neuroscience* **115**, 475–482.

Connor MJ & Sidell N (1997) Retinoic acid synthesis in normal and Alzheimer diseased brain and human neural cells. *Mol Chem Neurophathol* **30**, 239–252.

Enderlin V, Higuieret D & Alfos S, *et al.* (2000) Vitamin A deficiency decreases the expression of RAR $\beta$  and RXR $\beta/\gamma$  in adult mouse brain: effect of RA administration. *Nutr Neurosci* **3**, 173–181.

Enderlin V, Pallet V & Alfos S, *et al.* (1997) Age-related decreases in mRNA for brain nuclear receptors and target genes are reversed by retinoic acid treatment. *Neurosci Lett* **229**, 125–129.

Etchamendy N, Enderlin V, Marighetto A, Pallet V, Higuieret P & Jaffard R (2000) Evidence for a role of vitamin A in higher cognitive functions. *Society Neurosci Abstr* **26**, 1748.

Etchamendy N, Enderlin V & Marighetto A, *et al.* (2001) Alleviation of a selective age-related relational memory deficit in mice by pharmacologically induced normalization of brain retinoid signaling. *J Neurosci* **21**, 6423–6429.

Gerendasy DD & Sutcliffe JG (1997) RC3/neurogranin, a postsynaptic calpacitin for setting the response threshold to calcium influxes. *Mol Neurobiol* **15**, 131–163.

Guadaño-Ferraz A, Escamez MJ, 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. *Mol Brain Res* **49**, 37–44.

Higuieret P & Garcin H (1982) Peripheral metabolism of thyroid hormones in vitamin A-deficient rats. *Annals Nutr Metab* **26**, 191–200.

Higuieret P & Garcin H (1984) Triiodothyronine and vitamin A-deficiency in the rat. *J Physiol (Paris)* **79**, 373–377.

Ingenbleek Y & Bernstein LH (1999) The nutritionally dependent adaptive dichotomy (NDAD) and stress hypermetabolism. *J Clinical Ligand Assay* **22**, 259–267.

Ingenbleek Y & De Visscher M (1979) Hormonal and nutritional status: critical conditions for endemic goiter epidemiology? *Metabolism* **28**, 9–19.

Iñiguez MA, Morte B & Rodriguez-Pena A, *et al.* (1994) Characterization of the promoter region and flanking sequences of the neuron-specific gene RC3 (neurogranin). *Brain Res Mol Brain Res* **27**, 205–214.

Jeannin E, Robyr D & Desvergne B (1998) Transcriptional regulatory patterns of the myelin basic protein and malic enzyme genes by the thyroid hormone receptors alpha1 and beta1. *J Biol Chem* **273**, 24239–24248.

- Kastner P, Mark M & Chambon P (1995) Nonsteroid nuclear receptors: what are genetic studies telling us about their role in real life? *Cell* **83**, 859–869.
- Környei Z, Toth B, Tretter L & Madarasz E (1999) Effects of retinoic acid on rat forebrain cells derived from embryonic and perinatal rats. *Neurochem Int* **33**, 541–549.
- Krezel W, Kastner P & Chambon P (1999) Differential expression of retinoid receptors in the adult mouse central nervous system. *Neuroscience* **89**, 1291–1300.
- Leclercq M & Bourgeay-Causse M (1981) Une méthode simple, fiable rapide: dosage simultané du rétinol et du tocophérol sérique par chromatographie liquide haute performance (A simple, reliable fast method: simultaneous proportioning of retinol and serum tocopherol by high performance liquid chromatography). *Revue Institut Pasteur Lyon* **14**, 475–496.
- 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.
- Maden M, Gale E & Zile M (1998) The role of vitamin A in the development of the central nervous system. *J Nutr* **128**, 471S–475S.
- 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, *et al.* (1992) Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-cis retinoic acid. *Genes Dev* **6**, 329–344.
- Martinez de Arrieta C, Morte B, Coloma A & Bernal J (1999) The human RC3 gene homolog, NRGN contains a thyroid hormone-responsive element located in the first intron. *Endocrinology* **140**, 335–343.
- Misner DL, Jacobs S & Shimizu Y, *et al.* (2001) Vitamin A deprivation results in reversible loss of hippocampal long-term synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 11714–11719.
- Morte B, Iñiguez MA, Lorenzo PI & Bernal J (1997) Thyroid hormone-regulated expression of RC3/neurogranin in the immortalized hypothalamic cell line GT1-7. *J Neurochem* **69**, 902–909.
- Murray MB, Zilz ND, McCreary NL, MacDonald MJ & Towle HC (1988) Isolation and characterization of rat cDNA clones for two distinct thyroid hormone receptors. *J Biol Chem* **263**, 12770–12777.
- Okamura K, Taurog A & Distefano JJ (1981) Elevated serum levels of T3 without metabolic effect in nutritionally deficient rats, attributable to reduced cellular uptake of T3. *Endocrinology* **109**, 673–675.
- Pailler-Rodde I, Garcin H, Higuieret P & Begueret J (1991) c-erb-A mRNA content and triiodothyronine nuclear receptor binding capacity in rat liver according to vitamin A status. *FEBS Lett* **289**, 33–36.
- Pak JH, Huang FL, Li J, *et al.* (2000) Involvement of neurogranin in the modulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, synaptic plasticity, and spatial learning: a study with knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 11232–11237.
- Pallet V, Audouin-Chevallier I, Verret C, Garcin H & Higuieret P (1994) Retinoic acid differentially modulates triiodothyronine and retinoic acid receptors in rat liver according to thyroid status. *Eur J Endocrinol* **131**, 377–384.
- Sabath DE, Broome HE & Prystowsky MB (1990) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mRNA is a major interleukin 2-induced transcript in a cloned T-helper lymphocyte. *Gene* **91**, 185–191.
- Savouré N, Nio C, Maudet M & Nicol M (1996) Liver transglutaminases and vitamin-A deficiency in hairless mice. *Ann Nutr Metab* **40**, 52–60.
- Schröder M & Carlberg C (1994) Thyroid hormone and retinoic acid receptors form heterodimers with retinoid X receptors on direct repeats, palindromes, and inverted palindromes. *DNA Cell Biol* **13**, 333–341.
- Sporn MB, Roberts AB & Goodman DS (1994) *The Retinoids. Biology, Chemistry and Medicine*, 2nd ed. New York, NY: Raven Press.
- Sterling P & Eyer J (1988) Allostasis: A new paradigm to explain arousal pathology. In *Handbook of Life Stress, Cognition and Health*, pp. 629–649 [S Fisher and J Reason, editors]. Chichester, UK: John Wiley.
- 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.
- Watson JB, Battenberg EF, Wong KK, Bloom FE & Sutcliffe J (1990) Subtractive cDNA cloning of RC3, a rodent cortex-enriched mRNA encoding a novel 78 residue protein. *J Neurosci Res* **26**, 397–408.
- Yagamata 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.
- 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, *et al.* (1999) Role of retinoids in the CNS: differential expression of retinoid binding proteins and receptors and evidence for presence of retinoic acid. *Eur J Neurosci* **11**, 407–416.

### **I.3. CONCLUSION**

Dans la première partie de ce travail de thèse, nous avons cherché à comprendre pourquoi l'administration d'AR chez des souris carencées en vitamine A ne restaurait pas l'expression de RC3 et ne supprimait pas certains déficits mnésiques associés.

Les travaux réalisés chez le rat nous ont montré que la carence vitaminique A s'accompagne, dans le cerveau des animaux, d'une baisse simultanée de l'activité des voies d'action de l'AR et de la T3.

L'administration d'AR aux animaux carencés provoque la réactivation de sa propre voie de signalisation (autorégulation) mais est sans effet sur l'expression de la neurogranine. Par contre, lorsque l'on administre la T3 à ces animaux carencés, on observe à la fois la réactivation de sa propre voie de signalisation (autorégulation) mais aussi de celle de l'AR (hétérorégulation). Dans ces conditions, il apparaît également une augmentation de l'expression de RC3.

Ces résultats suggèrent qu'au cours du développement de la carence en vitamine A, il apparaît des processus adaptatifs qui concernent à la fois la voie de signalisation de la T3 et celle de l'AR. Ce phénomène qui révèle, dans le cerveau, les relations étroites qui existent entre la vitamine A et les HT, a déjà été décrit dans le foie d'animaux carencés (Coustaut et al., 1996).

Par ailleurs, ces résultats suggèrent qu'au cours de la carence vitaminique A, l'évolution du statut thyroïdien devient un élément critique. En effet, l'apparition d'un statut "d'hypothyroïdie cellulaire" traduit par la baisse des récepteurs de la T3 doit contribuer à la perte de l'efficacité du traitement par l'AR chez l'animal carencé.

En revanche, l'efficacité du traitement par la T3 montre que, dans certaines conditions, la réactivation des voies de signalisation est encore possible chez l'animal carencé.

Le vieillissement provoque une baisse simultanée de l'activité des voies de signalisation de l'AR et de la T3 dans le cerveau des animaux. Nous venons de montrer qu'à un stade avancé de la carence vitaminique A, le statut thyroïdien devient prépondérant et que seul le traitement par la T3 permet d'obtenir une réinduction des voies d'action de l'AR et de la T3.

Un phénomène comparable est-il envisageable au cours du vieillissement ?

C'est à cette question que nous avons voulu répondre dans la suite de ce travail.



## **II. ACTION CELLULAIRE DE L'ACIDE RETINOÏQUE ET DE LA TRIODOTHYRONINE CHEZ DES RATS AGES**

Dans le chapitre précédent, nous avons montré que le développement d'une carence en vitamine A s'accompagne de processus adaptatifs qui se traduisent, notamment, par la baisse de l'activité de la voie d'action de l'AR mais aussi de celle de la T3. Ces données constituent une nouvelle illustration des relations étroites qui existent entre ces deux voies de signalisation et sont en accord avec les résultats qui ont été obtenus chez la souris carencée en vitamine A (Etchamendy et al., 2003). Plus particulièrement, l'administration d'AR aux animaux carencés a provoqué la réinduction de sa propre voie de signalisation dans le cerveau des animaux, mais ce traitement est resté sans effet sur l'expression de la neurogranine. Cette perte d'efficacité de l'AR, déjà constatée chez la souris carencée, nous a amené à suggérer l'implication du statut thyroïdien dans ce phénomène. Les résultats de l'administration de T3 chez l'animal carencé plaident en faveur de cette hypothèse. En effet, l'action de la T3 s'exerce à la fois sur sa propre voie de signalisation mais également sur celle de l'AR. La réinduction de l'activité des deux voies d'action par la T3 laisse présager des récupérations fonctionnelles qui devront être explorées par des études comportementales.

D'autres résultats acquis au laboratoire, en collaboration avec le laboratoire de Neurosciences Cognitives, ont montré que (i) le vieillissement cérébral s'accompagne d'une baisse de l'activité de la voie de signalisation de l'AR chez des souris âgées (Enderlin et al., 1997a) et (ii) l'administration d'AR à ces animaux provoque la suppression de déficits mnésiques spécifiques du vieillissement (Etchamendy et al., 2001). Ces conditions expérimentales ont révélé l'efficacité du traitement par l'AR sur le statut cognitif mais on peut s'interroger sur les limites de cette efficacité, notamment en fonction du statut thyroïdien. On sait en effet que la fonction thyroïdienne est altérée au cours du vieillissement et que les sujets âgés évoluent fréquemment vers un statut d'hypothyroïdie (Diez, 2002 ; Chuo et Lim, 2003). C'est la raison pour laquelle, dans la suite de ce travail, nous avons voulu comparer les effets des traitements par l'AR et la T3 chez l'animal âgé.



## **II.1. EFFETS COMPARES DE L'ADMINISTRATION D'ACIDE RETINOÏQUE OU DE TRIODOTHYRONINE SUR L'ACTIVITE DE LEURS VOIES DE SIGNALISATION DANS LE CERVEAU DE RATS AGES.**

Dans cette étude, nous nous sommes particulièrement intéressés à l'expression de RC3 dans l'hippocampe, le striatum et le cortex qui représentent trois régions cérébrales enrichies en neurogranine jouant un rôle important dans les processus mnésiques (Kandel et Pittenger, 1999 ; White et McDonald, 2002). Par ailleurs, pour préciser le rôle respectif des voies d'action de l'AR et de la T3 dans les altérations de la plasticité synaptique associées au vieillissement, nous avons étudié l'expression d'un gène cible de l'AR codant pour la neuromoduline ou GAP43 (Encinas et al., 2000 ; Anderson et al., 2001).

Les résultats obtenus au cours de cette étude font l'objet de **l'article 2** qui a été accepté et est sous presse pour *Neurobiology of Aging*.

### **II.1.1. Méthodologie utilisée**

Deux groupes de rats "Adultes" (6 mois) et "Agés" (24 mois) ont reçu une administration d'AR ou de T3 24H avant le sacrifice. Les modes d'administration diffèrent en partie de ceux utilisés lors de l'étude précédente mais sont comparables à ceux déjà réalisés au laboratoire (Pallet et al., 1994 et 1997). Les rats âgés, séparés en trois lots, ont reçu soit (i) une dose de 5 mg d'AR/kg de poids corporel par voie orale ou (ii) une dose de 150 µg d'AR/kg de poids corporel par jour pendant 4 jours, par injection intrapéritonéale ou enfin (iii) une dose de 500 µg de T3/kg de poids corporel par injection intrapéritonéale.

Nous avons mesuré, dans le cerveau des animaux de chaque groupe (adultes, âgés, âgés traités par l'AR ou la T3), l'expression des récepteurs nucléaires RARβ, RXRβ/γ et TRα/β, ainsi que l'expression (ARNm et protéines) de RC3 et GAP43. Enfin l'expression de RC3 et de GAP43 dans différentes zones cérébrales (cortex, hippocampe, striatum) a été étudiée par hybridation *in situ*.

## **II.1.2. Principaux résultats et discussion partielle**

### Effet de l'âge sur les voies d'action de l'AR et de la T3

Nos résultats mettent en évidence une baisse de l'activité de la voie d'action de l'AR mais également de celle de la T3 chez les animaux âgés. En effet, nous avons observé une diminution du taux des ARNm des récepteurs nucléaires RAR $\beta$ , RXR $\beta/\gamma$  et TR $\alpha/\beta$  et une diminution de l'expression de RC3 et GAP43 (ARNm et protéines). L'ensemble des zones cérébrales étudiées (le cortex frontal, pariétal et piriforme, les sous régions de l'hippocampe et le striatum dorsal) voient leur teneur en RC3 diminuer avec l'âge. Ces résultats sont en accord avec ceux précédemment obtenus dans le laboratoire et ceux d'autres auteurs (Enderlin et al., 1997a,b ; Casoli et al., 2001). De plus, par une technique d'hybridation *in situ*, nous avons montré que l'expression de GAP43 est significativement diminuée avec l'âge dans différentes zones cérébrales (le cortex frontal, pariétal et piriforme, et le champ CA3 de l'hippocampe) (données non présentées).

### Effet de l'administration d'AR ou de T3 à des animaux âgés

L'administration d'AR restaure uniquement le niveau de ses propres récepteurs nucléaires (RAR $\beta$ , RXR $\beta/\gamma$ ) et de l'un de ses gènes cibles (GAP43). Ces résultats mettent en évidence la capacité d'autorégulation de l'AR sur sa propre voie d'action. En effet, l'AR a la capacité de réguler ses propres récepteurs par l'intermédiaire d'un RARE, mais, peut également réguler l'expression de nombreuses protéines impliquées dans la synthèse et le métabolisme de l'AR (De Thé et al., 1989 ; Enderlin et al., 1997a, b ; Encinas et al., 2000).

En revanche, l'administration de T3 rétablit l'expression de l'ensemble des récepteurs nucléaires (RAR $\beta$ , RXR $\beta/\gamma$  et TR $\alpha/\beta$ ) et de leurs gènes cibles (RC3 et GAP43) à un niveau comparable à celui mesuré chez les animaux adultes dans le cerveau entier. Le striatum semble particulièrement sensible aux effets de la T3 ; ce qui a déjà été rapporté par Iñiguez et al. (1992). Ces données illustrent les capacités d'autorégulation et d'hétérorégulation de la T3 sur sa propre voie d'action et sur celle de l'AR au cours du vieillissement chez l'animal (Lebel et al., 1993 ; Mano et al., 1993 ; Iñiguez et al., 1996).



**PUBLICATION 2**

**DIFFERENTIAL EFFECT OF RETINOIC ACID AND  
TRIODOETHYRONINE ON THE AGE-RELATED HYPO-  
EXPRESSION OF NEUROGRANIN IN RAT**





## Differential effect of retinoic acid and triiodothyronine on the age-related hypo-expression of neurogranin in rat

C. Féart, F. Mingaud, V. Enderlin, M. Husson, S. Alfos, P. Higuieret, V. Pallet\*

*Unité de Nutrition et Signalisation Cellulaire (E.A. MENRT; USC INRA) ISTAB,  
Avenue des Facultés, Université Bordeaux I, 33405 Talence cedex, France*

Received 2 March 2004; received in revised form 10 June 2004; accepted 21 June 2004

### Abstract

Given the important role of retinoids and thyroid hormone for optimal brain functioning and the tenuous relationship between retinoic acid (RA) and triiodothyronine (T3) signalings, we compared the effects of RA or T3 administrations on RA and T3 nuclear receptors (RAR, RXR and TR) and on their target genes, neuromodulin (GAP43) and neurogranin (RC3) in 24-month-old rats.

Quantitative real time PCR and western blot analysis allowed us to verify that retinoid and thyroid signalings and GAP43 and RC3 expression are affected by age. By *in situ* hybridization we observed a decreased expression of RC3 in hippocampus, striatum and cerebral cortex.

RAR $\beta$ , RXR $\beta/\gamma$  and GAP43 were up-regulated by RA as well as T3 treatment. The abundance of TR $\alpha/\beta$  mRNA and RC3 expression were only increased by T3 administration in the whole brain. This up-regulator effect of T3 on RC3 was only observed in the striatum.

During aging, T3 become a limiting factor alone able to correct the age-related concomitant hypo-activation of retinoid and thyroid signalings and alterations of synaptic plasticity.

© 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Age; Retinoic acid (RAR and RXR) and triiodothyronine (TR) nuclear receptors; Neurogranin (RC3); Neuromoduline (GAP43) and brain

### 1. Introduction

The roles of the retinoids, derivatives of the Vitamin A, in many physiological functions such as vision, immunity, cellular differentiation or proliferation or regulation of gene expression are at least in part well known [7,55]. The action of Vitamin A is mediated through its active metabolite, retinoic acid (RA), by two classes of nuclear receptors: the retinoic acid receptors (RAR $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ ) able to bind all-*trans* stereoisomer of retinoic acid (RA), and the retinoid X receptors (RXR $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ ), which bind the 9-*cis* stereoisomer. These receptors belong to the steroid/thyroid hormone nuclear receptor superfamily and are DNA-binding proteins [1], which, upon activation by specific retinoid ligands, induce gene transcription by interacting with distinct

promoter sequences in the target genes predominantly in the form of RAR/RXR heterodimers [35,42]. Recent research concerning the role of Vitamin A in the brain suggests that retinoid signaling plays an important role during mouse embryonic development [40], and that retinoid receptors contribute to specific functions in the adult central nervous system as well [32,45]. The presence of the two classes of retinoid receptors in different adult mouse central nervous system areas [36] and the high level of cellular retinol and retinoic acid-binding proteins in the adult brain [61] indeed, indicate an involvement of retinoids in specific physiological brain functions. In the brain, RAR $\beta$  is the main isoform expressed and RXR $\beta$  and RXR $\gamma$  are also largely expressed at high levels [41]. Moreover, knockout mice for RAR $\beta$  and RAR $\beta$ –RXR $\gamma$  display an alteration of synaptic plasticity as well as substantial performance deficits in a hippocampal-dependent spatial learning task [9]. Among the genes whose expression is regulated by retinoic acid,

\* Corresponding author. Tel.: +33 5 40 00 87 21; fax: +33 5 40 00 27 76.  
E-mail address: v.pallet@istab.u-bordeaux1.fr (V. Pallet).

and in addition to those coding for their own receptors, there are genes of two identified neuron specific proteins involved in synaptic plasticity: neuromodulin or GAP43 [52,53] and neurogranin or RC3 [34]. GAP43, a pre-synaptic PKC substrate, which is associated with the cytoplasmic face of the axonal growth-cone membrane, has been implicated in different forms of synaptic plasticity, including neurite outgrowth, regeneration and long term potentiation (LTP) [2,25]. The post-synaptic PKC substrate, RC3, is a postnatal onset protein, which accumulates in forebrain dendritic spines where a high degree of plasticity is maintained throughout life [26]. An increased amount of the phosphorylated form of RC3 has been reported during the maintenance phase of LTP [8]. More recently, it has been shown that mice lacking the RC3 gene exhibited deficits in hippocampal synaptic plasticity and spatial learning impairment [46]. RC3 is mainly expressed in the hippocampus, the striatum and the cerebral cortex [26].

Although aging is associated with a clear decline in cognitive functions [20,49], the structural and cellular bases of these changes remain poorly defined. Recently, evidence has been presented that aging leads to hypo-expression of retinoid signaling pathway in the brain in mice and rats. This hypo-expression may be the consequence of a decrease in retinoic acid bio-availability and is associated with an age-related reduction in neuron plasticity (characterized by hypo-expression of RC3). These studies showed that older rats and mice, which displayed lower level of brain RAR $\beta$  and RXR $\beta/\gamma$  mRNA with respect to younger adults, also had severely and specifically impaired memory performance [16,21]. Likewise, in the same studies, retinoic acid administration restored, to pre-senescent levels, the age-related deficits observed, confirming that a fine regulation of retinoid mediated gene expression seems fundamentally important for optimal brain function.

Data comparable to those obtained in aged animals have recently been obtained in Vitamin A deficient animals, i.e. hypo-expression of retinoid nuclear receptors and RC3 as well as memory impairment. Surprisingly, RA administration to depleted animals failed to fully restore the Vitamin A deficient-related hypo-expression of RC3, and had no effect on associated cognitive deficit [18,22]. The hypo-activity of the retinoid pathway, induced by Vitamin A deficiency, is accompanied by a hypo-activity of T3 signaling, which becomes a limiting factor, because it impedes RA from exerting its modulator effect [32].

Numerous studies have reported the close relationship between retinoid and thyroid signaling [10,54,58]. Like retinoic acid, triiodothyronine (T3) mediates its effect through binding to nuclear receptors (TR), which are ligand-inducible transcription factors. RXR is the common partner for the formation of RAR, or TR functional heterodimers, indicating that the retinoid and thyroid signaling pathways converge through the direct interaction of their respective nuclear receptors [38,60]. Interestingly, the RC3 gene is well known to be at once a T3 and RA responsive gene [44].

Interestingly, alterations in thyroid function have also been frequently reported as arising with age [12,15]. Most of the thyroid disorders described in elderly people are related to central hypothyroidism. Indeed, serum basal and free T3 concentrations have been shown to be inversely correlated with age [13,19].

Taking these data into account, the aim of the present paper is to investigate the involvement of thyroid signaling in the function of retinoic acid and in age-related neurobiological alterations. First, the status of aged animals related to retinoid and thyroid pathways in brain was determined. Then, effects of RA or T3 administration on RA and T3 nuclear receptor expression were compared in the whole brain of aged rats. Finally, in order to fully understand the consequences on the brain functioning, we studied the expression of neuromodulin (GAP43) and neurogranin (RC3). In the whole brain, the levels of mRNA and proteins were evaluated by using respectively real time PCR and western blot analysis. On the other hand, RC3 mRNA were also quantified by an in situ hybridization study in three regions of brain enriched in RC3: hippocampus, striatum and cerebral cortex [34].

## 2. Materials and methods

### 2.1. Experimental design

The study was conducted in accordance with the European Community's Council Directives (861609/EEC). All the experiments conformed with the Guidelines on the Handling and Training of Laboratory Animals. Weanling male Wistar rats were purchased from Harlan (Gannat, France). They were maintained in a room with a constant airflow system, controlled temperature (21–23 °C) and a 12 h light: dark cycle. The rats had ad libitum access to food and tap water. They were randomly divided into two groups designated as Adult ( $n = 16$ ), and Aged ( $n = 52$ ). Adult rats were studied at 6 months of age and aged rats at 24 months. Adult rats received an intragastric intubation ( $n = 8$ ) or intraperitoneal injection ( $n = 8$ ) of a vehicle without RA or T3. The aged rats were then divided in four groups: one group of non-treated rats (called Aged), received an intragastric intubation ( $n = 8$ ) or intraperitoneal injection ( $n = 8$ ) of the vehicle, a second group (Aged + RA) received a single dose of 5 mg of retinoic acid (*all-trans* RA; Sigma no. R 2625)/kg body weight by intragastric intubation ( $n = 12$ ) [16,48], a third group (Aged + 4d RA) were injected intraperitoneally daily with 150  $\mu$ g of RA/kg body weight for 4 days ( $n = 12$ ) [32], and the last group (Aged + T3) were injected intraperitoneally with 500  $\mu$ g of triiodothyronine (T3, Sigma no. T2752)/kg body weight ( $n = 12$ ) [47]. T3 or RA was classically dissolved in a mixture containing polyethyleneglycol/NaCl/ethanol (70/20/10) for intraperitoneal injection or RA was dissolved in an oil mixture for the intragastric intubation. Rats were sacrificed by

decapitation 24 h after treatments. The liver and the brain were rapidly removed and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for subsequent analysis.

## 2.2. Quantification of mRNA

### 2.2.1. Total RNA preparation

Half of a rat brain was directly homogenized in 10 ml TRIzol reagent (Invitrogen, France) and total RNA was extracted following the manufacturer's suggested protocol. Purified RNA was quantified and assessed for purity by UV spectrophotometry.

### 2.2.2. Reverse transcription

Using specific primers of the gene studied, cDNA was synthesized with Superscript reverse transcriptase (Invitrogen, France) according to the protocol recommended by the manufacturer with minor modifications described by Redonnet et al. [51].

### 2.2.3. Analysis of gene expression using real-time PCR

The polymerase chain reaction (PCR) was carried out using a LightCycler system (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), which combined the processes of amplification and detection (by fluorescence) of PCR products, thereby enabling on-line and real-time detection. To detect target gene amplification products, LightCycler DNA Master SYBR Green was used according to the manufacturer's instructions. The PCR reactions were performed in microcapillary tubes in a final volume of  $20\ \mu\text{l}$  containing LC-DNA Master SYBR Green mix,  $4\ \text{mM}$  of  $\text{MgCl}_2$ ,  $0.5\ \mu\text{M}$  of each primer and  $2.5\ \text{mg}$  of cDNA. The amplification conditions were  $95^{\circ}\text{C}$  for 10 min to activate the polymerase, followed by 40 cycles of denaturation at  $95^{\circ}\text{C}$  for 6 s, annealing at about  $60^{\circ}\text{C}$  (according to the gene studied) for 6 s, and elongation at  $72^{\circ}\text{C}$  for 10 s. After each elongation phase, the fluorescence of SYBR Green (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 similar to those used by Husson et al. [33]. For each primer pair used, melting curve analysis showed a single melting peak after amplification, indicating a specific product.

Quantification data were analyzed using the LightCycler Relative Quantification Software (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Due to the fact that target and reference (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)) gene have different sequences and amplicon lengths it is probable that they show different PCR efficiencies. It is the reason why this software provides a calibrator-normalized relative quantification including PCR efficiency correction (Fig. 1). In our case, the calibrator was chosen among the untreated aged rats. RNA of the brain were prepared and reverse transcribed as described above. The cDNA obtained was used as calibrator in all the experiments. Results are expressed as the target/reference

ratio divided by the target/reference ratio of the calibrator.

## 2.3. In situ hybridization

This experiment was conducted exactly as described by Husson et al. [33] on 6 rats of each group of Adult, Aged, Aged + RA and Aged + T3. For assessment of the relative amounts of RC3 mRNA in various regions of rat 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 [24]. The mRNA densities for each region in Adult and Aged (treated or not) rats was expressed as a percentage of the mean mRNA density

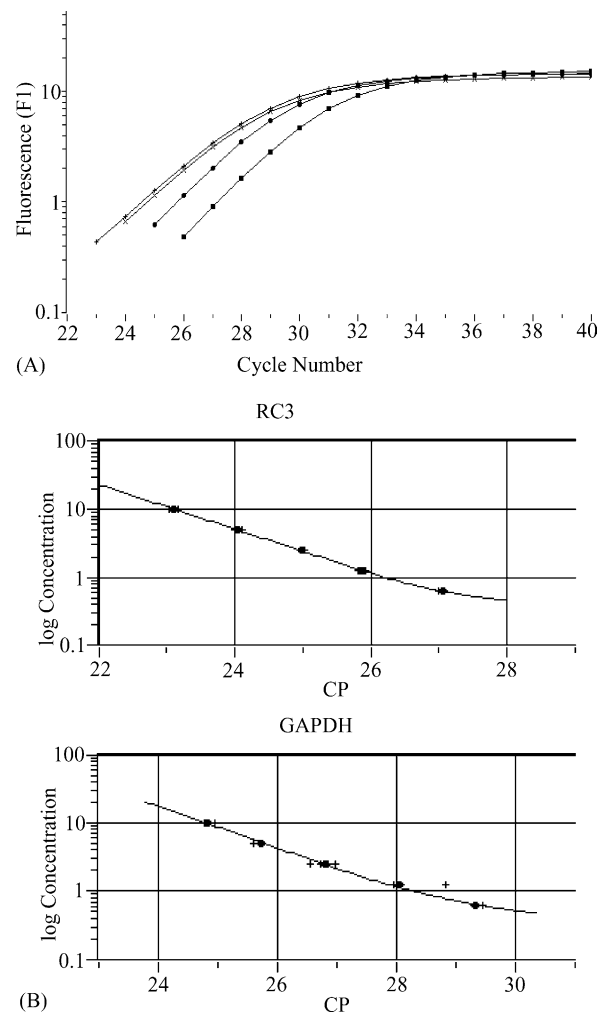


Fig. 1. (A) Amplification curves for RC3 and GAPDH in adults and aged rats ((●) RC3—Adult; (■) RC3—Aged; (○) GAPDH—Adult; (×) GAPDH—Aged). (B) Standard curves for RC3 and GAPDH. The figure shows the initial cDNA log concentration plotted vs. the crossing point (Cp) for the detection of significant fluorescence.

observed in the control (Adult) group within the same brain region.

#### 2.4. Western blot analysis

Western blot analysis was performed on half of a rat brain according to the procedure of Watson [57] with minor modifications described by Husson et al. [32] for the experiment concerning RC3 and  $\beta$ -actin. The expression of GAP43 was analyzed as described by Husson et al. [33]. The staining intensity of protein bands was determined using an image analyser (Bio 1D, Vilber Lourmat). The relative levels of RC3, GAP43 and  $\beta$ -actin proteins were determined as percent of RC3, GAP43 and  $\beta$ -actin respectively of adult rats. Results concerning  $\beta$ -actin loading control has been positioned in results.

#### 2.5. Assays

##### 2.5.1. Proteins

Proteins were determined according to Bradford [5] using a Bio-Rad protein assay (Bio-Rad Laboratories, Munich, Germany).

##### 2.5.2. Serum retinol

Serum retinol was assayed by high-performance liquid chromatography according to the method of Leclercq and Bourgeay-Causse [37].

##### 2.5.3. Serum triiodothyronine

Serum total T3 was assayed by radioimmunoassay using a specific kit (Immunotech, France).

#### 2.6. Statistical analysis

Values are given as mean  $\pm$  S.E.M. The statistical significance of differences between means was calculated by ANOVA followed by Student's *t*-test ( $P < 0.05$ ) using Statgraphics *Plus* software.

### 3. Results

#### 3.1. Status of aged rats

##### 3.1.1. Serum retinol and triiodothyronine concentrations

A significant reduction ( $-20\%$ ) in serum retinol concentration was observed in aged animals relative to controls ( $0.91 \pm 0.06 \mu\text{mol/L}$  versus  $1.16 \pm 0.06 \mu\text{mol/L}$ ). The concentration of triiodothyronine also significantly decreased with aging even if this reduction was less than for retinol ( $1.11 \pm 0.02 \text{ nmol/L}$  versus  $1.00 \pm 0.02 \text{ nmol/L}$ ).

##### 3.1.2. Expression of retinoic acid and triiodothyronine nuclear receptors and target genes (GAP43 and RC3) in the whole brain

The results are summarized in Table 1.

A significant decrease in the level of retinoic acid nuclear receptors was observed in the brain of aged animals. The amount of RAR $\beta$  and RXR $\beta/\gamma$  mRNA were decreased by  $-46\%$  and  $-41\%$  respectively compared to controls.

Interestingly, the brain of aged rats also exhibited a decreased abundance ( $-26\%$ ) of TR $\alpha/\beta$  mRNA relative to adult rats.

Concerning the target genes, the expression of neurogranin and neuromodulin were measured quantifying the amount of their mRNA as well as of their proteins.

Present data show that the quantity of mRNA of neuromodulin largely diminished with aging ( $-61\%$ ). This is also the case for the amount of expressed proteins of GAP43, which decreased by  $-21\%$  in aged rats relative to adults.

The results of the quantification of neurogranin expression indicated an age-related decreased in the amount of mRNA as well as of protein by approximately  $-25\%$ .

##### 3.2. Effects of retinoic acid or triiodothyronine administration on nuclear receptors and target genes (GAP43 and RC3) in the whole brain

The results are summarized in Table 1.

Table 1

Effects of aging and RA or T3 administration on the amount of mRNA of nuclear receptors (RAR $\beta$ , RXR $\beta/\gamma$  and TR $\alpha/\beta$ ), and on the amount of mRNA and protein of target genes (GAP43 and RC3) in the whole brain of rats

	Nuclear receptors (mRNA (relative values))			Target genes			
	RAR $\beta$	RXR $\beta/\gamma$	TR	GAP43		RC3	
				mRNA (relative values)	Protein (%controls)	mRNA (relative values)	Protein (%controls)
Adult	$0.24 \pm 0.04$ a	$1.46 \pm 0.06$ a	$0.46 \pm 0.03$ a	$4.80 \pm 0.57$ a	$100 \pm 4$ a	$0.66 \pm 0.03$ a	$100 \pm 5$ a
Aged	$0.13 \pm 0.01$ b	$0.86 \pm 0.04$ b	$0.34 \pm 0.02$ b	$1.86 \pm 0.23$ b	$79 \pm 2$ b	$0.48 \pm 0.03$ b	$77 \pm 1$ b
Aged + RA	$0.24 \pm 0.04$ a	$1.14 \pm 0.09$ c	$0.32 \pm 0.03$ b	$3.96 \pm 0.59$ a	$91 \pm 3$ a	$0.46 \pm 0.02$ b	$71 \pm 4$ b
Aged + 4d RA	$0.21 \pm 0.02$ a	$1.09 \pm 0.12$ c	$0.31 \pm 0.07$ b	$4.22 \pm 0.86$ a	$96 \pm 2$ a	$0.48 \pm 0.03$ b	$82 \pm 3$ b
Aged + T3	$0.20 \pm 0.02$ a	$1.87 \pm 0.10$ d	$0.41 \pm 0.02$ a	$3.12 \pm 0.48$ a	$102 \pm 3$ a	$0.65 \pm 0.02$ a	$97 \pm 2$ a

Data represent the mean  $\pm$  S.E.M. of measures performed on 5–10 rats and were analyzed using ANOVA followed by Student's *t*-test. For each column, different alphabets (a–d) indicate statistical differences between values obtained in each group of rats ( $P < 0.05$ ).

### 3.2.1. Nuclear receptors

In aged rats, administration of RA, a single dose or during 4 days, induced increased amounts of RAR $\beta$  (+84%, +61%, respectively) and RXR $\beta/\gamma$  (+32%, +27%, respectively) mRNA in the brain. However, the abundance of TR $\alpha/\beta$  mRNA was unchanged. On the other hand, administration of T3 generated an increased abundance of the mRNA of the retinoid receptors as well as of TR $\alpha/\beta$  (+53% for RAR $\beta$ , +117% for RXR $\beta/\gamma$  and +21% for TR $\alpha/\beta$ ).

### 3.2.2. Target genes

The effects of exogenous administration of RA or T3 on GAP43 and RC3 expression were different. RA, as a single dose as well as during 4 days, led to an increased expression of the neuromodulin gene, observable at the mRNA (+113% and +127%) and protein (+16% and +21%) levels but interestingly was without effect on the expression of neurogranin.

Administration of T3 to aged rats led to an increased expression of both the target genes studied. Thus, GAP43 as well as RC3 genes exhibited an increased amount of mRNA (+68% and +35%, respectively) and of their proteins (+28% and +26%, respectively).

In each experiment, immunoblots of aged (treated or not) and control brain homogenate with  $\beta$ -actin antibody (detected as a single band migrating at 42 kDa) revealed no differences of intensity between all the groups (Fig. 2).

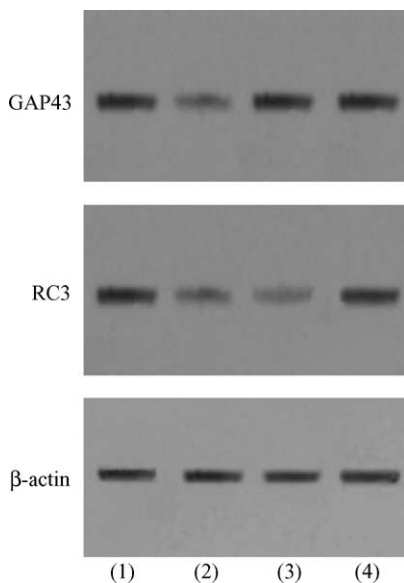


Fig. 2. A representative Western blot of GAP43, RC3 and  $\beta$ -actin in Adult (1), Aged (2), Aged + RA (3) and Aged +T3 (4) rats. Densitometric quantification of band intensities corresponding to  $\beta$ -actin showed no difference between the four groups of rats.

### 3.3. Effects of aging and retinoic acid or triiodothyronine administration on the expression of neurogranin in cortex, striatum and hippocampus

An example of distribution pattern of neurogranin mRNA expression in the cerebral cortex, dorsal striatum and hippocampus subfields is illustrated Fig. 3.

The results are summarized on Fig. 4.

#### 3.3.1. Effects of aging

Our present data revealed that aging is accompanied by an alteration of RC3 mRNA level in all the regions studied, i.e. cerebral cortex, dorsal striatum and hippocampus. In various cortex areas, a significantly reduced amount of RC3 mRNA was observed in aged rats relative to controls (–33% in the frontal cortex, –40% in the parietal cortex and –55% in the piriform cortex). Such a decreased expression of RC3 mRNA was also observed in the striatum (–51%) and in the hippocampus subfields (–38% in the subiculum, –31% in the CA1, –29% in the CA3 and –22% in the dentate gyrus).

#### 3.3.2. Effects of retinoic acid or triiodothyronine administration

The abundance of RC3 mRNA remains unchanged after RA treatment in all the cerebral subfields studied. Our present data evidenced that administration of T3 to aged rats normalized the expression level of RC3 in the dorsal striatum (+97%). Except in the CA3, where T3 led to a decreased amount (–23%) of the mRNA of RC3, in the others hippocampus subfields, T3 administration remained without effect on the age-related decreased expression of RC3. Moreover, no modification was observed in the cerebral cortex areas.

## 4. Discussion

### 4.1. Status of aged rats

In order to study the effect of T3 on brain retinoic acid and triiodothyronine signaling in aged rats, the function of these pathways was first examined in 24 months old rats. Together, all the results obtained in this experiment established the decline in the brain of retinoid but also thyroid signaling with aging. Several authors have evoked similar results in rats and mice [16,17]. Further data shown that knockout mice for RAR $\beta$  or RAR $\beta$ /RXR $\gamma$  exhibited a long term potentiation (LTP) deficit [9].

The decreased expression of nuclear receptors described in aged rats may be due to a reduction in the bio-availability of the receptor ligands, i.e. retinoic acid and triiodothyronine, with aging since a significant decrease in retinol and triiodothyronine concentrations was observed in the serum of 24 months old rats. The positive responsiveness of retinoic acid receptors to RA has been demonstrated [14,59] as well as the positive regulation of transcription of the TR gene by

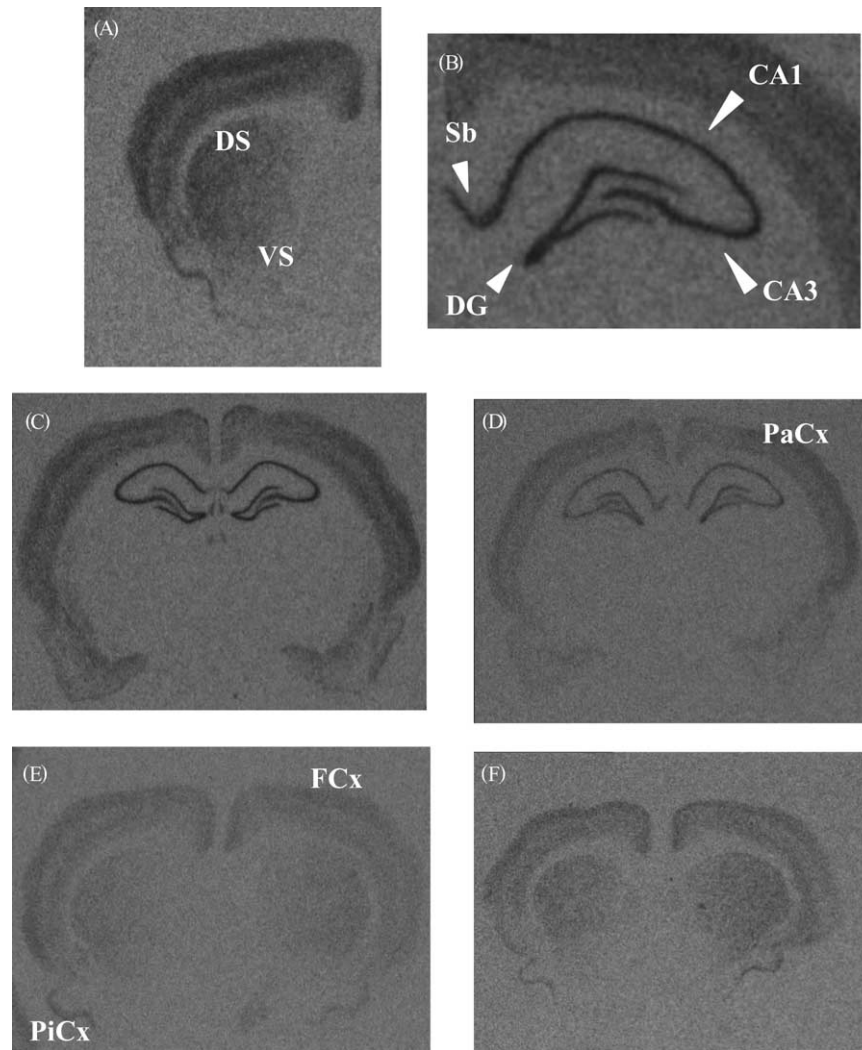


Fig. 3. Distribution pattern of neurogranin mRNA expression in the cerebral cortex, dorsal striatum and hippocampus subfields. Dark-field photomicrographs of coronal sections represent RC3 transcripts as visualized by in situ hybridization. Different subfields of hippocampus and striatum are shown in (A) and (B). Note that aging significantly reduced RC3 mRNA levels in the dorsal hippocampus (C: adult, D: aged) and in the dorsal striatum and in different cortex subfields (data not shown), and that T3 administration restores to pre-senescent levels the RC3 mRNA in the dorsal striatum (E: aged, F: aged + T3). CA1, field CA1 of Ammon's horn, pyramidal layer; CA3, field CA3 of Ammon's horn, pyramidal layer; DG, dentate gyrus, granular layer; Sb, subiculum; FCx, frontal cortex; PaCx, parietal cortex; PiCx, piriform cortex; DS, dorsal striatum; VS, ventral striatum.

T3 [14,30]. The collapse of retinoid and thyroid signaling activity with aging may be related to alterations in retinoid metabolism and thyroid dysfunction, which occur with senescence. Age-related alterations in Vitamin A metabolism, particularly plasma retinol concentration have been reported in rats and humans [4,56]. Vitamin A deficiency has also been identified in elderly subjects [29]. In addition, changes in thyroid function are often described in elderly people. There are reports of similarities between the signs of hypothyroidism and clinical features of healthy elderly subjects [23] and increased TSH secretion with aging [31].

The hypo-activity of retinoid and thyroid signaling observed in the aged animals was associated with a decreased expression of genes encoding for neural proteins, which are RA and/or T3 target genes, and implicated in synaptic plasticity, neurogranin (RC3) and neuromodulin (GAP43). The age-

related decreased expression of RC3 has already been demonstrated in mice, where it was correlated with a LTP deficit and severe age-specific memory impairment [21].

When the effect of aging on RC3 mRNA content in each individual subfield was analyzed separately a significant effect of age was found in all the subfield studied, i.e. the cerebral cortex (frontal, parietal and piriform subfield), the hippocampus (subiculum, CA1, CA3 and dentate gyrus) and the dorsal striatum. Interestingly, the present results are similar to those described in Vitamin A deficient rats where a reduced amount of RC3 mRNA was first observed in the striatum and somewhat later, when the deficiency became more pronounced, in the hippocampus [33]. Moreover, Vitamin A deficient mice, which present brain RAR $\beta$ , RXR $\beta/\gamma$  and RC3 hypo-expression, demonstrated age-specific memory loss [22].



Concerning the second neural protein studied, neuromodulin (GAP43), a reduction in its expression has been shown using immuno-detection in the hippocampus of aged female rats relative to the level of adult animals [6]. This protein has been implicated in different forms of synaptic plasticity, including neurite outgrowth, regeneration and LTP [52]. *In vitro*, failure to induce GAP43 has been shown to inhibit neural differentiation and leads to cell death [43].

Thus, it is possible to assume that the retinoid and thyroid signaling dysfunction occurring with aging initiates alterations in the neural plasticity of which decreased expression of RC3 and GAP43 is the molecular indicator.

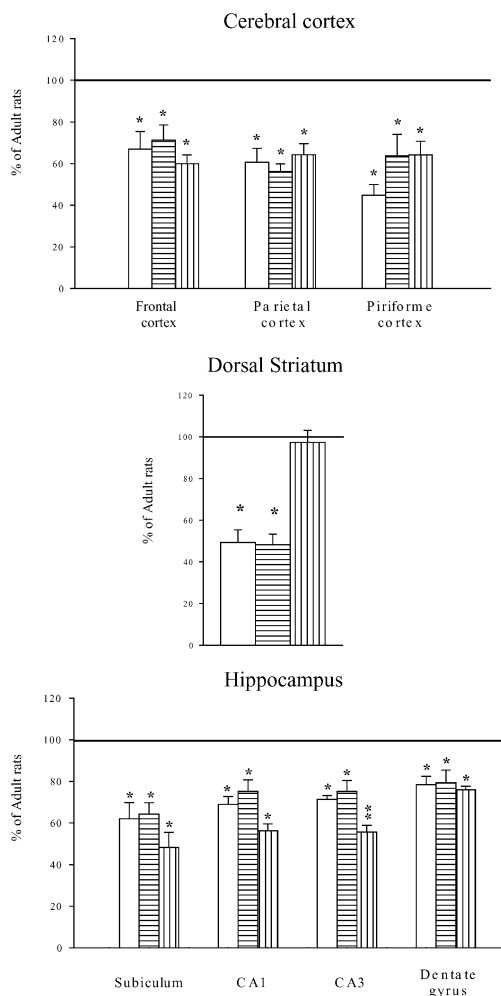


Fig. 4. Level of neurogranin mRNA in different subfields of cerebral cortex, dorsal striatum and hippocampus in Adults and Aged (treated by RA or T3 or not) rats. Histograms show optical density values (mean  $\pm$  S.E.M.) measured on 6 rats of each group which were analyzed using ANOVA followed by Student's *t*-test. (\*) Significantly different from adult rats,  $P < 0.05$ . (\*\*\*) Significantly different from aged rats,  $P < 0.05$ . CA1, field CA1 of Ammon's horn, pyramidal layer; CA3, field CA3 of Ammon's horn, pyramidal layer ((□) Aged; (▨) Aged + RA; (▧) Aged + T3).

#### 4.2. Effects of RA or T3 administration on retinoid and thyroid dysfunction in aged rats

##### 4.2.1. RA administration

As expected, RA treatment exerted an up-regulation of its own receptors. Whatever the way of administration, a single dose or daily during 4 days, RA is very effective on RAR $\beta$  expression and it also significantly, although more slightly, up regulated RXR $\beta/\gamma$ . This positive action of RA on its own signaling had a repercussion on the expression of GAP43, which was also increased by RA treatment.

The present data, which constituted new evidence of the *in vivo* action of RA on GAP43, are consistent with those describing an *in vitro* up regulation of GAP43 by retinoids (retinol and retinoic acid) [11,27]. Unexpectedly, RA had no effect on T3 signaling. It did not induce any modification in the expression of receptors—the amount of mRNA coding for TR was unchanged—and no modification of the expression of RC3 mRNA or proteins. This was unexpected because previous studies, performed in mice, have described the contrary, i.e. the capacity of RA to correct RC3 modifications induced by age [17,21].

The *in situ* hybridization analysis in RA administrated old rats confirmed this result. It shown that RA failed to normalize the expression of RC3 in each of the subfields analyzed. This data was comparable to those described in Vitamin A deficient rats where RA remains without effect on T3 signaling [33].

In sum, these molecular data, obtained in RA-treated aged rats, imply that the significant deficiency in synaptic plasticity occurring in elderly animals, produced by hypo-expression of retinoid and thyroid signaling, were only partially corrected by RA administration. Only one of the two neural proteins studied in this experiment, GAP43, was up-regulated by RA treatment. Interestingly, the other, RC3, is at once a RA and T3 target gene, and the T3 receptors expression remained unchanged by RA treatment.

Results achieved in the liver, where RA had no incidence on the hypo-expression of mRNA coding for TR, corroborated results obtained in the brain (the non-efficacy of RA to reverse the T3 signaling age-related hypo-expression), confirming an impaired function of RA in these animals (data not shown).

##### 4.2.2. T3 administration

Administration of T3 was accompanied by complete restoration of all the molecular parameters studied. Its reversing effect was, of course, obvious on its own signaling with a normalization of its receptor mRNA. T3 was also effective in restoring the age-related decrease in retinoid signaling up to the adult level.

It should be emphasized that between both retinoid receptors targeted by T3, RXR $\beta/\gamma$  was the most up-regulated. This observation is coherent with previous evidence showing a relationship between RXR and thyroid function [39]. In this experiment, T3 alone induced normalization of the

age-related retinoid and thyroid hypo-expression and re-established the level of downstream-activated proteins supporting the functional synaptic properties (RC3 and GAP43). Similar observation was performed by *in situ* hybridization in the dorsal striatum in which T3 treatment allowed the normalization of the amount of RC3 mRNA. The region specific sensitivity of the striatal RC3 to T3 has been well described in the literature particularly in hypothyroidism [28,50]. To explain such a region-specific control of RC3 it is possible to suppose a combinatorial distribution of transcription factors, as already evoked [3], including T3 receptors as well as T3 associative factors and above all the retinoic acid receptors. The striatum has been, indeed, described as a region very enriched in retinoic acid receptors what is not the case for the hippocampus and the cortex, in which the expression of RAR $\beta$  mRNA and RXR $\beta/\gamma$  mRNA are undetectable [33]. The region-specific regulation of RC3 emphasizes the arguments of Zetterström et al. [61] suggesting a predominant role of retinoids in gene regulatory events in adult striatum due to specific expression pattern of retinoid binding protein and aldehyde dehydrogenase as well as to the presence of RA in this region. Besides, striatum is highly sensitive to Vitamin A deficiency as well as hypothyroidism, situations that are latent in aged animal.

On the whole, these results are comparable to recent data in Vitamin A deficient rats showing a similar retinoid and thyroid signaling hypo-function and the associated synaptic plasticity deficiency only totally restored by T3 administration [32]. They are also consistent with experiments, which have shown that RA has no effect on cognitive impairment in Vitamin A deprived animals as has also been seen in aged mice [22]. The comparison of the present results with those obtained in Vitamin A deficient animals [32], suggests that similar a phenomenon occurs with aging. Thyroid signaling would become preponderant (i.e. limiting) in the genesis of neurobiological alteration and maintenance when the concomitant age-related hypo-activation of retinoid and thyroid signaling reaches a certain level. This is of crucial significance because T3 would then alone be able to correct the synaptic plasticity deficiency of aged animals. The decreased retinol and also triiodothyronine serum level measured in aged rats support this hypothesis and explain the discrepancy with the previous results obtained in aged mice where such serum levels were not reported to be modified and where RA was still efficient [16,17].

At first, when the reduction is still not too great, the hypo-activation of thyroid and retinoid signaling arising with aging is re-inducible by either RA or T3. Afterwards, it would seemed that the collapse of the signaling pathways proceeds and aged animals continue to develop thyroid disorders, among other things characterized by synaptic plasticity alterations, which is then reversed only by T3 treatment. Previous data have suggested that brain retinoid-signaling hypo-function may be a potential target for therapeutic attempts. The present study seems to indicate that in order to design

prevention or therapeutic essays, thyroid signaling must also be considered.

## Acknowledgements

This research was supported by the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) and by the Conseil Régional d'Aquitaine. The authors wish to thank L. Caune for animal care.

## References

- [1] Aranda A, Pascual A. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev* 2001;81:1269–304.
- [2] Benowitz LI, Routtenberg A. GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity. *Trends Neurosci* 1997;20:84–91.
- [3] Bernal J, Guadano-Ferraz A, Morte B. Perspectives in the study of thyroid hormone action on brain development and function. *Thyroid* 2003;13:1005–12.
- [4] Borel P, Mekki N, Boirie Y, Partier A, Alexandre-Gouabau MC, Grolhier P, et al. Comparison of the postprandial plasma vitamin A response in young and older adults. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 1998;53:B133–40.
- [5] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54.
- [6] Casoli T, Di Stefano G, Gracciotti N, Giovagnetti S, Fattoretti P, Solazzi M, et al. Cellular distribution of GAP-43 mRNA in hippocampus and cerebellum of adult rat brain by *in situ* RT-PCR. *J Histochem Cytochem* 2001;49:1195–6.
- [7] Chambon P. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J* 1996;10:940–54.
- [8] Chen SJ, Sweatt JD, Klann E. Enhanced phosphorylation of the post-synaptic protein kinase C substrate RC3/neurogranin during long-term potentiation. *Brain Res* 1997;749:181–7.
- [9] Chiang MY, Misner D, Kempermann G, Schikorski T, Giguere V, Sucov HM, et al. An essential role for retinoid receptors RARbeta and RXRgamma in long-term potentiation and depression. *Neuron* 1998;21:1353–61.
- [10] Chin WW, Yen PM. Molecular mechanisms of nuclear thyroid hormone action. In: Braverman LE, editor. *Totowa*; 1997.
- [11] Chiu FC, Feng L, Chan SO, Padin C, Federoff JH. Expression of neurofilament proteins during retinoic acid-induced differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. *Brain Res Mol Brain Res* 1995;30:77–86.
- [12] Chuo AM, Lim JK. Thyroid dysfunction in elderly patients. *Ann Acad Med Singapore* 2003;32:96–100.
- [13] Cizza G, Brady LS, Calogero AE, Bagdy G, Lynn AB, Kling MA, et al. Central hypothyroidism is associated with advanced age in male Fischer 344/N rats: *in vivo* and *in vitro* studies. *Endocrinology* 1992;131:2672–80.
- [14] Coustaut M, Pallet V, Garcin H, Higeret P. The influence of dietary vitamin A on triiodothyronine, retinoic acid, and glucocorticoid receptors in liver of hypothyroid rats. *Br J Nutr* 1996;76:295–306.
- [15] Diez JJ. Hypothyroidism in patients older than 55 years: an analysis of the etiology and assessment of the effectiveness of therapy. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2002;57:E315–20.
- [16] Enderlin V, Alfos S, Pallet V, Garcin H, Azais-Braesco V, Jaffard R, et al. 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* 1997;412:629–62.

- [17] Enderlin V, Pallet V, Alfos S, Dargelos E, Jaffard R, Garcin H, et al. Age-related decreases in mRNA for brain nuclear receptors and target genes are reversed by retinoic acid treatment. *Neurosci Lett* 1997;229:125–9.
- [18] Enderlin V, Higuere D, Alfos S, Husson M, Jaffard R, Higuere P, et al. Vitamin A deficiency decreases the expression of RAR $\beta$  and RXR $\beta$  in adult mouse brain: effect of RA administration. *Nutr Neurosci* 2000;3:173–81.
- [19] Erfurth EM, Hagmar LE. Decreased serum testosterone and free triiodothyronine levels in healthy middle-aged men indicate an age effect at the pituitary level. *Eur J Endocrinol* 1995;132:663–7.
- [20] Erickson CA, Barnes CA. The neurobiology of memory changes in normal aging. *Exp Gerontol* 2003;38:61–9.
- [21] Etchamendy N, Enderlin V, Marighetto A, Vouimba RM, Pallet V, Jaffard R, et al. Alleviation of a selective age-related relational memory deficit in mice by pharmacologically induced normalization of brain retinoid signaling. *J Neurosci* 2001;21:6423–9.
- [22] Etchamendy N, Enderlin V, Marighetto A, Pallet V, Higuere P, Jaffard R. Vitamin A deficiency and relational memory deficit in adult mice: relationships with changes in brain retinoid signalling. *Behav Brain Res* 2003;145:37–49.
- [23] Finucane P, Anderson C. Thyroid disease in older patients. Diagnosis and treatment. *Drugs Aging* 1995;6:268–77.
- [24] Franklin KBJ, Paxinos G. The mouse brain in stereotaxic coordinates. San Diego: Academic Press; 1997.
- [25] Gerendasy DD, Herron SR, Jennings PA, Sutcliffe JG. Calmodulin stabilizes an amphiphilic alpha-helix within RC3/neurogranin and GAP-43/neuromodulin only when Ca<sup>2+</sup> is absent. *J Biol Chem* 1995;270:6741–50.
- [26] Gerendasy DD, Sutcliffe JG. RC3/neurogranin, a postsynaptic calpacitin for setting the response threshold to calcium influxes. *Mol Neurobiol* 1997;15:131–63.
- [27] Grummer MA, Zachman RD. Interaction of ethanol with retinol and retinoic acid in RAR beta and GAP-43 expression. *Neurotoxicol Teratol* 2000;22:829–36.
- [28] 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* 1997;49:37–44.
- [29] Haller J, Weggemans RM, Lammi-Keefe CJ, Ferry M. Changes in the vitamin status of elderly Europeans: plasma vitamins A, E, B-6, B-12, folic acid and carotenoids. *SENECA Investigators. Eur J Clin Nutr* 1996;50:S32–46.
- [30] Higuere P, Pallet V, Coustaut M, Audouin I, Begueret J, Garcin H. Retinoic acid decreases retinoic acid and triiodothyronine nuclear receptor expression in the liver of hyperthyroidic rats. *FEBS Lett* 1992;310:101–5.
- [31] Hollowell JG, Staehling NW, Flanders WD, Hannon WH, Gunter EW, Spencer CA, et al. Serum TSH, T(4), and thyroid antibodies in the United States population (1988 to 1994): National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:489–99.
- [32] Husson M, Enderlin V, Alfos S, Féart C, Higuere 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* 2003;90:191–8.
- [33] Husson M, Enderlin V, Alfos S, Boucheron C, Pallet V, Higuere P. Expression of neurogranin and neuromodulin is affected in the striatum of vitamin A deprived rats. *Mol Brain Res* 2004;123:7–17.
- [34] Iniguez MA, Morte B, Rodriguez-Pena A, Munoz A, Gerendasy D, Sutcliffe JG, et al. Characterization of the promoter region and flanking sequences of the neuron-specific gene RC3 (neurogranin). *Brain Res Mol Brain Res* 1994;27:205–14.
- [35] Kastner P, Mark M, Ghyselinck N, Krezel W, Dupe V, Grondona JM, et al. Genetic evidence that the retinoid signal is transduced by heterodimeric RXR/RAR functional units during mouse development. *Development* 1997;124:313–26.
- [36] Krezel W, Kastner P, Chambon P. Differential expression of retinoid receptors in the adult mouse central nervous system. *Neuroscience* 1999;89:1291–300.
- [37] Leclercq M, Bourgeay-Causse M. A simple, reliable fast method: simultaneous proportioning of retinol and serum tocopherol by high performance liquid chromatography. *Revue Institut Pasteur Lyon* 1981;14:475–96.
- [38] Li D, Li T, Wang F, Tian H, Samuels HH. Functional evidence for retinoid X receptor (RXR) as a nonsilent partner in the thyroid hormone receptor/RXR heterodimer. *Mol Cell Biol* 2002;22:5782–92.
- [39] Macchia PE, Jiang P, Yuan YD, Chandarardna RA, Weiss RE, Chas-sande O, et al. RXR receptor agonist suppression of thyroid function: central effects in the absence of thyroid hormone receptor. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002;283:E326–31.
- [40] Maden M. Role and distribution of retinoic acid during CNS development. *Int Rev Cytol* 2001;209:1–77.
- [41] Mangelsdorf DJ, Borgmeyer U, Heyman RA, Zhou JY, Ong ES, Oro AE, et al. Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-*cis* retinoic acid. *Genes Dev* 1992;6:329–44.
- [42] Mangelsdorf DJ, Evans RM. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 1995;83:841–50.
- [43] Mani S, Shen Y, Schaefer J, Meiri KF. Failure to express GAP-43 during neurogenesis affects cell cycle regulation and differentiation of neural precursors and stimulates apoptosis of neurons. *Mol Cell Neurosci* 2001;17:54–66.
- [44] Martinez de Arrieta C, Morte B, Coloma A, Bernal J. The human RC3 gene homolog, NRGN contains a thyroid hormone-responsive element located in the first intron. *Endocrinology* 1999;140:335–43.
- [45] McCaffery P, Dräger UC. High levels of a retinoic acid-generating dehydrogenase in the meso-telencephalic dopamine system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:7772–6.
- [46] Pak JH, Huang FL, Li J, Balschun D, Reymann KG, Chiang C, et al. 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* 2000;97:11232–7.
- [47] Pallet V, Audouin-Chevallier I, Verret C, Garcin H, Higuere P. Retinoic acid differentially modulates triiodothyronine and retinoic acid receptors in rat liver according to thyroid status. *Eur J Endocrinol* 1994;131:377–84.
- [48] Pallet V, Azais-Braesco V, Enderlin V, Grolier P, Noel-Suberville C, Garcin H, et al. Aging decreases retinoic acid and triiodothyronine nuclear expression in rat liver: exogenous retinol and retinoic acid differentially modulate this decreased expression. *Mech Aging Dev* 1997;99:123–36.
- [49] Park HL, O'Connell JE, Thomson RG. A systematic review of cognitive decline in the general elderly population. *Int J Geriatr Psychiatr* 2003;18:1121–34.
- [50] Piosik PA, van Groenigen M, Ponne NJ, Bolhuis PA, Baas F. RC3/neurogranin structure and expression in the caprine brain in relation to congenital hypothyroidism. *Brain Res Mol Brain Res* 1995;29:119–30.
- [51] Redonnet A, Bonilla S, Noel-Suberville C, Pallet V, Dabadie H, Gin H, et al. 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* 2002;26:920–7.
- [52] 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* 2000;97:7657–62.
- [53] Saunders DE, Hannigan JH, Zajac CS, Wappler NL. Reversal of alcohol's effects on neurite extension and on neuronal GAP43/B50, N-myc, and c-myc protein levels by retinoic acid. *Brain Res Dev Brain Res* 1995;86:16–23.

- [54] 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* 1994;13:333–41.
- [55] Sporn MB, Roberts AB, Goodman D. The retinoids: biology, chemistry, and medicine. In: Press R, editor. Raven Press, New York; 1994.
- [56] Van der Loo B, Labugger R, Aebischer CP, Bachschmid M, Spitzer V, Kilo J, et al. Age-related changes of vitamin A status. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004;43:26–30.
- [57] Watson JB, Battenberg EF, Wong KK, Bloom FE, Sutcliffe JG. Subtractive cDNA cloning of RC3, a rodent cortex-enriched mRNA encoding a novel 78 residue protein. *J Neurosci Res* 1990;26:397–408.
- [58] Wolf G. The regulation of the thyroid-stimulating hormone of the anterior pituitary gland by thyroid hormone and by 9-*cis*-retinoic acid. *Nutr Rev* 2002;60:374–7.
- [59] Yagamata T, Momoi T, Kumagai H, Nishikawa T, Yanagisawa M, Momoi M. Distribution of retinoic acid receptor b proteins in rat brain: up-regulation by retinoic acid. *Biomed Res* 1993;14:183–90.
- [60] Yen PM. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev* 2001;81:1097–142.
- [61] Zetterström RH, Lindqvist E, Mata de Urquiza A, Tomac A, Eriksson U, Perlmann T, et al. Role of retinoids in the CNS: differential expression of retinoid binding proteins and receptors and evidence for presence of retinoic acid. *Eur J Neurosci* 1999;11:407–16.

### **II.1.3. Conclusion**

Cette étude avait pour objectif de comparer les effets d'un traitement par l'AR ou par la T3 sur l'activité de leurs voies de signalisation dans le cerveau d'animaux âgés. Nos résultats sont comparables à ceux que nous avons obtenus chez l'animal carencé, à savoir que (i) l'AR réinduit sa propre voie de signalisation dans le cerveau de l'animal âgé et que (ii) la T3 réactive sa propre voie d'action mais aussi celle de l'AR. Par ailleurs, dans ces conditions expérimentales, et contrairement à ce que nous avons déjà décrit chez l'animal âgé, l'AR est sans effet sur l'expression des récepteurs de la T3 et de la neurogranine (Enderlin et al., 1997a,b). Ces données soulignent que les processus adaptatifs qui accompagnent la carence vitaminique A sont également en jeu au cours du vieillissement et affectent les voies de signalisation de l'AR et de la T3. Ces résultats suggèrent aussi que l'évolution du statut thyroïdien peut devenir avec l'âge un "élément limitant" dans la fonctionnalité de l'AR.

C'est la raison pour laquelle dans la suite de ce travail, nous avons voulu mieux comprendre la relation entre l'hypoexpression de la voie d'action de la T3 et la fonctionnalité de l'AR. Les expériences ont été réalisées dans le foie des animaux âgés car nous souhaitons aussi confirmer nos résultats sur un organe essentiel du métabolisme des rétinoïdes.



## **II.2. EFFETS COMPARES DE L'ADMINISTRATION D'ACIDE RETINOÏQUE OU DE TRIODOTHYRONINE SUR L'ACTIVITE DE LEURS VOIES D'ACTION DANS LE FOIE DE RATS AGES.**

Les résultats que nous avons obtenus dans le cerveau de rats âgés sont en partie différents de ceux précédemment acquis au laboratoire puisque l'administration d'AR ne permet plus l'activation de la voie d'action des hormones thyroïdiennes hypoexprimée avec l'âge. Nous avons alors choisi de poursuivre cette étude dans le foie des rats âgés pour vérifier si nous obtenions les mêmes résultats dans cet organe. Nous voulions comprendre par cette approche si le statut thyroïdien pouvait devenir "limitant" au cours du vieillissement. Ceci pourrait être un indice d'un effet des altérations du statut thyroïdien liées à l'âge sur l'ensemble de l'organisme.

### **II.2.1. Méthodologie utilisée**

Les animaux utilisés dans cette étude sont en partie les mêmes que ceux présentés dans le chapitre précédent. Nous avons mesuré les capacités maximales de liaison (Cmax) des récepteurs nucléaires RAR et TR dans le foie d'animaux adultes, âgés et âgés ayant reçu de l'AR (une dose de 5 mg/kg de poids corporel par voie orale). Nous avons aussi mesuré les taux des ARNm des RAR $\beta$  et TR $\alpha/\beta$ , et l'activité de la transglutaminase tissulaire (tTG). L'enzyme malique (ME) est régulée par les HT dans le foie, les reins et le cœur et la présence d'un TRE dans le promoteur de son gène a été démontré (Petty et al., 1990 ; Jeannin et al., 1998). C'est pourquoi nous avons utilisé l'activité hépatique de cette enzyme comme un marqueur du niveau d'activité de la voie d'action de la T3.

Les différents protocoles utilisés dans ces expériences sont détaillés dans les publications du laboratoire (Pallet et al., 1994 et 1997).

### **II.2.2. Principaux résultats**

Les principaux résultats sont résumés dans les **tableaux VI et VII**.

Ces résultats montrent que l'âge s'accompagne d'une hypoactivité des voies d'action des rétinoïdes et des HT dans le foie. En effet, les animaux âgés présentent une diminution

dans le foie de la Cmax des RAR et des TR ainsi qu'une baisse du taux des ARNm des RAR $\beta$  et TR $\alpha/\beta$ . De même, les activités enzymatiques de la transglutaminase tissulaire (tTG) et de l'enzyme malique (ME) diminuent fortement avec l'âge (-55% et -70% respectivement), et traduisent les effets de l'hypoexpression des récepteurs nucléaires de l'AR et de la T3 sur leurs gènes cibles.

L'administration d'AR ne permet que la réactivation de sa propre voie d'action (la Cmax des RAR et l'expression des RAR $\beta$  deviennent comparables à celles des animaux adultes). De plus, l'activité de la tTG est restaurée par l'administration d'AR. Par contre, ce traitement n'a pas d'effet sur l'hypoexpression des TR $\alpha/\beta$ , sur la Cmax des TR ni sur l'activité de l'enzyme malique. Ces derniers résultats diffèrent de ceux déjà obtenus par Pallet et al. (1997) chez l'animal âgé.

Par ailleurs, l'administration de T3 permet de ramener l'activité de l'enzyme malique à un niveau comparable à celui mesuré chez des animaux adultes ; ce qui atteste de l'efficacité du traitement.

**Tableau VI : Effets de l'administration d'AR sur les capacités de liaison des RAR et TR et sur l'expression de RAR $\beta$  et TR $\alpha/\beta$  dans le foie de rats âgés**

	<b>RAR<math>\beta</math></b>	<b>RAR</b>	<b>TR<math>\alpha/\beta</math></b>	<b>TR</b>
	ARNm	Cmax	ARNm	Cmax
	Valeurs relatives	pmol/mg	Valeurs relatives	pmol/mg
Adultes	1.22 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>	0.50 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	1.11 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	0.29 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>
Agés	0.73 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>	0.36 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	0.40 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	0.23 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>
Agés + RA	1.18 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	0.49 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	0.43 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	0.24 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>

Les valeurs représentent les moyennes  $\pm$  SEM obtenues sur 6 animaux de chaque groupe. Dans chaque colonne, des lettres différentes indiquent des différences significatives à  $p < 0.05$ . (Analyse ANOVA suivie du test 't' de Student).



**Tableau VII : Effets de l'administration d'AR ou de T3 sur les activités enzymatiques de la tTG et de la ME dans le foie de rats âgés**

	tTG	ME
	Activité pmol/h/mg protéines	Activité nmol/min/mg protéines
Adultes	0.45 ± 0.05 <sup>a</sup>	16.8 ± 0.5 <sup>a</sup>
Agés	0.21 ± 0.01 <sup>b</sup>	5.1 ± 0.4 <sup>b</sup>
Agés + RA	0.38 ± 0.02 <sup>a</sup>	4.5 ± 0.4 <sup>b</sup>
Agés + T3	nd	12.8 ± 1.2 <sup>c</sup>

Les valeurs représentent les moyennes ± SEM obtenues sur 6 animaux de chaque groupe. Dans chaque colonne, des lettres différentes indiquent des différences significatives à p<0.05. (Analyse ANOVA suivie du test 't' de Student).  
nd : non déterminé

### II.2.3. Discussion partielle

Les résultats obtenus dans le foie des rats âgés montrent que l'administration d'AR est sans effet sur les marqueurs de l'activité de la voie de signalisation de la T3. Ces résultats sont à rapprocher de ceux que nous avons déjà obtenus dans le cerveau de ces animaux. Sur ce point, ces données diffèrent d'autres données déjà acquises au laboratoire, qui avaient montré, chez l'animal âgé, l'activation de la voie de la T3 par le traitement par l'AR.

Pour expliquer ces différences dans l'efficacité du traitement par l'AR chez l'animal âgé, nous avons proposé l'intervention du statut thyroïdien. Plusieurs arguments plaident en faveur de cette hypothèse et témoignent d'un statut d'hypothyroïdie plus sévère chez les animaux âgés qui présenteraient alors une "sensibilité" diminuée au traitement par l'AR. En effet, nous avons mis en évidence chez ces animaux, contrairement aux résultats obtenus dans les autres séries de rats âgés, une baisse significative de la concentration sérique en T3. Par ailleurs, l'activité hépatique de l'enzyme malique, considérée comme un bon indicateur de l'activité cellulaire de la T3, est baissée de près de 70% dans le foie des animaux âgés. Cette baisse très importante apporte la preuve de la forte perturbation de la voie d'action de la T3 chez les animaux âgés étudiés. A titre de comparaison, dans les précédentes expériences menées au laboratoire, l'activité hépatique de la ME n'était diminuée que de 26% chez des

rats âgés, ou de 30% chez des rats rendus hypothyroïdiens par rapport aux animaux adultes (Pallet et al., 1994, 1997).

L'ensemble de ces données montre que les rats âgés utilisés dans cette étude présentaient un statut d'hypothyroïdie plus marqué que celui des animaux précédemment utilisés au laboratoire.

#### **II.2.4. Conclusion**

L'objectif de cette étude était de mieux comprendre dans quelle mesure le statut thyroïdien pouvait altérer l'efficacité du traitement par l'AR chez l'animal âgé. Nos résultats montrent que l'administration d'AR a permis de restaurer la capacité maximale de liaison des RAR et l'expression de RAR $\beta$  dans le foie des animaux âgés. L'activité hépatique de la transglutaminase tissulaire est également augmentée chez les animaux âgés, témoignant de l'efficacité du traitement par l'AR sur sa propre voie d'action. Par contre, l'administration d'AR n'a pas eu d'effet sur l'expression des récepteurs de la T3 qui restent hypoexprimés dans le foie des animaux âgés. L'activité hépatique de l'enzyme malique, diminuée de près de 70% avec l'âge, permet de rendre compte de la forte baisse de l'activité de la voie d'action des HT. L'administration de T3 à ces animaux âgés permet de corriger la baisse de l'activité de la ME et démontre ainsi l'efficacité du traitement par la T3 sur sa propre voie d'action dans le foie.

Confrontées aux données déjà acquises au laboratoire, ces résultats montrent (i) que le vieillissement met en jeu des processus adaptatifs qui concernent à la fois la voie d'action de l'AR et celle de la T3, (ii) qu'à un certain stade du vieillissement, l'hypoactivité de la voie de signalisation de la T3 devient critique et (iii) qu'à ce stade seule l'administration de T3 permet la réactivation des voies d'action de la T3 et de l'AR.

Ces différents points seront discutés par la suite.

**CHAPITRE III**  
***ETUDES BIOMEDICALES***



### ***CHAPITRE III : ETUDES BIOMEDICALES***

A ce jour, de nombreux travaux de biologie cellulaire et moléculaire visent à mieux comprendre les mécanismes d'intervention des récepteurs nucléaires dans le contrôle de l'expression génique et les processus physiopathologiques. Dans ce domaine de recherche, les approches chez l'homme ne sont que faiblement documentées. La majeure partie des données bibliographiques a été obtenue sur des modèles expérimentaux et ce n'est que très récemment que des travaux cliniques se sont consacrés à l'expression des récepteurs nucléaires dans différentes pathologies (cancer, diabète, obésité, maladie d'Alzheimer...). Les résultats de ces travaux permettent d'envisager que les récepteurs nucléaires pourraient constituer des marqueurs précoces de certaines pathologies, mais aussi des cibles thérapeutiques (Dauncey et al., 2001 ; Furr, 2004). C'est dans ce courant de recherche que s'inscrivent les travaux de recherche clinique présentés ci-après.

Les données expérimentales obtenues dans l'Unité de Nutrition et Signalisation Cellulaire en collaboration avec le laboratoire de Neurosciences Cognitives montrent que le vieillissement génère une hypoactivité de la voie de signalisation de l'AR qui contribue au déclin cognitif (Etchamendy et al., 2001). Le vieillissement génère également l'hypoactivité de la voie de signalisation des HT, phénomène qui devient limitant, empêchant l'efficacité d'un traitement par l'AR. Il est donc envisageable que les récepteurs nucléaires de l'AR et de la T3 puissent constituer des cibles pharmacologiques potentielles chez l'homme âgé.

La seconde partie de ce travail de thèse, destinée à éprouver nos hypothèses chez l'homme, a fait l'objet de deux études cliniques. La recherche a été menée en collaboration avec l'équipe "Epidémiologie et neuropsychologie du vieillissement cérébral" dirigée par le Professeur JF. Dartigues (Unité INSERM 593) d'une part, et avec le Professeur A. Tabarin du service "d'Endocrinologie, diabétologie et maladies métaboliques" de l'hôpital Haut-Levêque dirigé par le Pr. P. Roger (CHU Bordeaux) d'autre part.

Cette approche originale, avait pour objectif général de vérifier que les conséquences des variations des statuts rétinolde ou thyroïdien sur les récepteurs nucléaires étaient mesurables dans les cellules mononucléées du sang (PBMC pour *peripheral blood mononuclear cells*). Pour cela, nous avons isolé ces cellules et y avons mesuré l'expression des différents sous-types de récepteurs de l'AR et de la T3.

Dans la première étude biomédicale que nous avons menée, nous avons comparé l'expression des récepteurs nucléaires de l'AR et des HT de sujets adultes et âgés afin de déterminer les effets du vieillissement sur les voies de signalisation de l'AR et de la T3 chez l'homme.

Par la suite, nous avons mis en œuvre une seconde étude biomédicale dont l'objectif était de déterminer les conséquences d'une hypothyroïdie sur l'expression des récepteurs nucléaires de la T3 et surtout de l'AR dans les PBMC de sujets humains.

Les résultats obtenus lors de ces deux études mettent en évidence une diminution significative de l'expression des récepteurs nucléaires de l'AR et de la T3 dans les PBMC chez l'homme, notamment une diminution du taux d'expression des RAR $\gamma$  et TR $\beta$ , chez les sujets âgés mais également et d'une manière assez comparable chez les patients hypothyroïdiens.

# **I. EXPRESSION DES RECEPTEURS NUCLEAIRES DE L'ACIDE RETINOÏQUE ET DE LA TRIODOTHYRONINE DANS LES CELLULES MONONUCLEÉES DU SANG CHEZ LE SUJET AGE**

L'objectif de cette étude était de définir les conséquences du vieillissement sur les voies d'action de l'AR et des HT chez l'homme. Cette étude a été initiée dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe du Pr. JF Dartigues (INSERM U593). Cette équipe est impliquée dans l'étude épidémiologique dite des « 3 Cités » dont l'objectif initial est d'estimer le risque de démence et de détérioration cognitive sévère attribuables aux facteurs de risque (dont l'alimentation) et aux pathologies vasculaires (The 3C study group). L'étude des « 3 Cités », conduite à Bordeaux, Dijon et Montpellier, est une étude épidémiologique exceptionnelle, menée sur un nombre très important de personnes âgées de plus de 65 ans (9294 sujets exactement, recrutés par tirage au sort sur les listes électorales) suivies sur une période longue (4 ans). A l'inclusion et au cours des 4 années d'études suivantes, les sujets âgés répondent à un questionnaire permettant d'évaluer leurs statuts nutritionnel et cognitif, et subissent une prise de sang destinée à l'analyse de différents paramètres sanguins, et à la préparation des cellules mononucléées.

Les données concernant les statuts vitaminique A et thyroïdien des sujets âgés ne sont pas univoques. Ainsi, selon les auteurs, la concentration en rétinol sérique est décrite soit augmentée, soit diminuée avec l'âge (Borel et al., 1998 ; van der Loo et al., 2004). Des études épidémiologiques décrivent même des cas de carence en vitamine A chez des sujets âgés (Haller et al., 1996). De même, les données concernant le statut thyroïdien des sujets âgés et son évaluation, par la mesure des concentrations en TSH, T4 et T3, sont parfois en contradiction (Ravaglia et al., 2000 ; Hollowell et al., 2002 ; Magri et al., 2002). Cependant, la littérature rapproche fréquemment les signes du vieillissement aux symptômes de l'hypothyroïdie. Par ailleurs, chez les sujets âgés, il a été montré une corrélation négative entre le taux de rétinol sérique et les concentrations en T4 libre ou en TSH (Ravaglia et al., 2000).

Les conséquences potentielles des altérations du statut vitaminique A ou thyroïdien chez l'homme sont importantes. En effet, la biodisponibilité réduite en AR pourrait, comme cela a été montré chez l'animal (Etchamendy et al., 2001), contribuer à l'apparition des troubles mnésiques classiquement associés au vieillissement normal, mais également, participer à l'étiologie des formes tardives de la maladie d'Alzheimer (Goodman et Pardee, 2003). De plus, les désordres thyroïdiens chez les personnes âgées sont décrits comme associés à des troubles cognitifs et de l'humeur (Manciet et al., 1995 ; Fukui et al., 2001 ; revue dans Bernal, 2002 ; Trémont et al., 2003).

Les résultats obtenus chez l'animal âgé nous ont conduit à formuler l'hypothèse selon laquelle les perturbations des statuts vitaminique A et thyroïdien survenant avec l'âge se concrétisaient par une diminution de la biodisponibilité en AR et en T3 au niveau cellulaire, dans l'ensemble des tissus cibles de l'organisme âgé (Enderlin et al., 1997a,b; Pallet et al., 1997; Publication 2). Ceci nous a amené à postuler que les cellules mononucléées étaient au nombre de ces tissus et à ce titre, pertinentes pour la mise en évidence des modifications des voies de signalisation de l'AR et de la T3 survenant avec l'âge chez l'homme.

Dans ce contexte, l'objectif principal de cette première étude biomédicale a été de vérifier si les modifications d'expression des récepteurs nucléaires des rétinoïdes et des HT, mises en évidence chez l'animal âgé, étaient perceptibles chez l'individu âgé.

Pour cela, nous avons mesuré l'expression de diverses isoformes de récepteurs des rétinoïdes (RAR $\alpha$ , RAR $\gamma$ , RXR $\alpha$ ) et des HT (TR $\alpha$  et TR $\beta$ ) dans les cellules mononucléées du sang de sujets adultes et âgés en bonne santé.

L'ensemble des résultats présentés dans cette étude fait l'objet de **l'article 3** qui a été soumis récemment au *European Journal of Endocrinology*.



## **I.1. METHODOLOGIE UTILISEE**

22 volontaires "jeunes" (de 24 à 57 ans) et 24 volontaires "âgés" (de 69 à 90 ans) issus de la cohorte "3C" ont été recrutés pour participer à cette étude. Dans un premier temps, le bilan clinique de chacun des volontaires a été réalisé dans les laboratoires des services de Biochimie de l'Hôpital Pellegrin et de Médecine Nucléaire de l'Hôpital Haut-Levêque (CHU de Bordeaux). Par la suite, nous avons mesuré l'expression de divers sous-types de récepteurs des rétinoïdes ( $RAR\alpha$ ,  $RAR\gamma$ ,  $RXR\alpha$ ) et des HT ( $TR\alpha$  et  $TR\beta$ ) dans les cellules mononucléées du sang des sujets recrutés, par RT-PCR en temps réel. Les volontaires qui constituent le groupe "jeune" ont été choisis selon leur âge (moins de 60 ans) et leur bon état de santé. Il est important de préciser que les sujets âgés de notre étude, recrutés par le Dr. Letenneur (INSERM U593), sont en bonne santé également et ne souffrent pas de troubles cognitifs avérés.

## **I.2. PRINCIPAUX RESULTATS ET DISCUSSION PARTIELLE**

L'analyse des indicateurs sériques du statut en vitamine A – le rétinol et la rétinol binding protein ou RBP-, ainsi que le calcul, plus original, du rapport "rétinol binding protéine - transthyrétine" (RBP:TTR) n'ont pas mis en évidence d'altérations du statut nutritionnel ou plus précisément du statut en vitamine A chez les volontaires âgés. Pourtant, au niveau nucléaire, l'expression de  $RAR\gamma$  est significativement diminuée dans les PBMC des sujets âgés comparés aux sujets jeunes. A notre connaissance, ce résultat constitue la première évidence, chez l'homme, d'une hypoactivation de la voie de signalisation des rétinoïdes avec l'âge. L'absence de modification du taux de rétinol circulant tend à confirmer l'hypothèse selon laquelle les altérations du statut rétinoïde concernent la biodisponibilité intracellulaire de l'AR. Cette hypothèse est renforcée par l'existence chez les sujets jeunes d'une corrélation positive et très significative entre la concentration en rétinol plasmatique et le taux des ARNm de  $RAR\gamma$  d'une part, et le ratio RBP:TTR et l'expression de  $RAR\gamma$  d'autre part ; corrélations qui disparaissent chez les sujets âgés. Il semble donc que chez les personnes âgées, les taux circulant ne reflètent plus la fonctionnalité de la voie de signalisation nucléaire de l'AR.

Par ailleurs, bien que demeurant dans les limites de références des laboratoires, la concentration de TSH des sujets âgés est significativement plus élevée que celle des sujets jeunes. Les concentrations en T3 et T4 libres, légèrement plus basses dans le groupe "jeune",

ne sont pas significativement modifiées d'un groupe à l'autre. Une élévation de TSH sans modification des concentrations de T3 et T4 est caractéristique d'un état d'hypothyroïdie dite subclinique, qui est difficile à diagnostiquer par ailleurs, car les symptômes sont subtils et souvent assimilés au vieillissement normal (Mohandas et Gupta, 2003). Pour autant, des données comparables avaient déjà été rapportées par Hollowell et al. (2000) et Magri et al. (2002).

Cette altération du statut thyroïdien des sujets âgés est confirmée par la mesure des taux d'expression des ARNm des récepteurs des HT dans les PBMC humains. Concernant ces récepteurs, nous rapportons une diminution, chez les sujets âgés, de l'expression des TR $\beta$  et dans une moindre mesure des TR $\alpha$ . Ce résultat est, par ailleurs, à rapprocher de ceux obtenus pour les RAR $\gamma$  ; c'est à dire une dichotomie entre les paramètres plasmatiques et l'expression des récepteurs nucléaires, traduisant des modifications de biodisponibilité en ligand au niveau cellulaire. Là encore, l'absence, chez les sujets âgés, de corrélation entre la concentration de T3 sérique et l'expression des TR $\beta$  ou entre le ratio RBP:TTR et ce même récepteur, existantes chez les sujets jeunes, semble aller dans le sens de notre interprétation.

**PUBLICATION 3**

**AGING AFFECTS THE RETINOIC ACID AND THE  
TRIODOETHYRONINE NUCLEAR RECEPTOR mRNA  
EXPRESSION IN HUMAN PERIPHERAL BLOOD  
MONONUCLEAR CELLS**



# **Aging affects the retinoic acid and the triiodothyronine nuclear receptor mRNA expression in human peripheral blood mononuclear cells**

C. FEART <sup>1,a</sup>, V. PALLET <sup>1,a,\*</sup>, C. BOUCHERON <sup>a</sup>, D. HIGUERET <sup>b</sup>, S. ALFOS <sup>a</sup>, L. LETENNEUR <sup>c</sup>, JF. DARTIGUES <sup>c</sup>, P. HIGUERET <sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Unité de Nutrition et Signalisation Cellulaire (E.A. MENRT, Usc INRA) ISTAB  
Avenue des Facultés Université Bordeaux I, 33405 Talence*

<sup>b</sup> *Service de Biochimie de l'Hôpital Pellegrin, Hôpitaux de Bordeaux, Centre Hospitalier Universitaire de  
Bordeaux, Place Amélie Raba Leon, 33000 Bordeaux*

<sup>c</sup> *INSERM U593 Université Victor Ségalen Bordeaux 2, 146 Rue Leo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex*

<sup>1</sup> The first two authors have contributed equally to this work

Key words : retinoic acid, triiodothyronine, nuclear receptors, human, aging, peripheral blood cells

This research was supported by a grant from the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), from the Conseil Régional d'Aquitaine and by the Institut de Recherche en Nutrition humaine en Aquitaine (IRNHA). 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-Synthélabo 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:* Inadequate retinoid status has often been described as occurring with aging. Moreover, sub-clinical hypothyroid status has also been evoked in the elderly. Several studies performed in animals have described the crucial incidence of age-related hypo-functioning of retinoid and thyroid signalling pathways, particularly in the brain.

*Objective:* The aim of the present study was to clarify whether aging modifies retinoid and thyroid signalling in humans.

*Methods:* Using real time RT-PCR the relative amount of mRNA of the retinoid (RAR $\alpha$ , RAR $\gamma$ , and RXR $\alpha$ ) and thyroid (TR $\alpha$  and TR $\beta$ ) nuclear receptors in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of young (24-57 years old, n=22) compared to elderly (69-90 years old, n=24) healthy subjects were quantitated. Classical plasma parameters, used to characterize the retinoid and thyroid status, retinol (ROH), Retinol Binding Protein (RBP), free T<sub>3</sub> (FT<sub>3</sub>) and T<sub>4</sub> (FT<sub>4</sub>), thyroid stimulating hormone (TSH) and transthyretin (TTR), were also assessed.

*Results:* RAR $\gamma$  expression was significantly decreased in elderly versus young subjects while no modification of the retinoid-related plasma parameters ROH and RBP were emphasized by aging. Concerning thyroid criteria, the elderly exhibited an increase in TSH concentration (+39%) without significant modifications of FT<sub>3</sub> and FT<sub>4</sub> which indicated an age-related sub-clinical hypothyroidism. Concurrently, the amount of TR mRNA ( $\alpha$  as well as  $\beta$  subtypes) was significantly decreased in the elderly.

*Conclusion:* These data constitute the first evidence of an age-related hypo-activation of the retinoid and thyroid nuclear pathways in PBMC. Further study of the possible association between the expression of the retinoid and thyroid nuclear receptors and age-related cognitive alterations in human would be interesting.

## **1. Introduction**

The aging process is a heterogeneous and inevitable phenomenon involving the entire integrity of the organism. The life expectancy and the number of elderly persons is increasing in industrialised countries for a large part as a consequence of improvements in health care (1). These observations contribute to the development of recent research on human aging mechanisms (2-5).

Hormones, some soluble mediators of the inflammatory response, free radicals, anti-oxidants and macro- and micro-nutrients, associated with aging-linked health damage, have been defined as potential markers of aging (6, 7). Among them, the markers involved in the status and function of vitamin A and thyroid hormones has gained considerable interest (8-10). Indeed, alterations in retinoid metabolism and thyroid dysfunction occur with senescence. Age-related alterations in vitamin A metabolism, particularly plasma retinol concentration have been reported in rats and humans (11, 12). Vitamin A deficiency has also been identified in elderly subjects (13). In addition, changes in thyroid function are often described in elderly people. There are reports of similarities between the signs of hypothyroidism and clinical features of healthy elderly subjects (14) and increased TSH secretion with aging (10, 15). Finally, in old people, plasma retinol is negatively associated with free T<sub>4</sub> and TSH serum level (15). All these data suggest an age-related collapse of vitamin A and thyroid status. Numerous links between diseases or disorders occurring with aging and alterations in these states have been evoked in the literature. The comparison between healthy centenarians and younger (80 years old and less) subjects has shown that very old people exhibit significantly higher plasma retinol levels (9).

Recently, Goodman and Pardee (16) reported an association between the late onset of Alzheimer's disease and abnormal retinoid metabolism. Moreover, several studies have also reported that dysfunction of the thyroid gland is a common clinical disease associated with aging (17-20). Investigations into the relationships between thyroid status and cognitive abilities in humans have shown that a deficit in thyroid hormones induces severe anatomic and functional alterations of the nervous system and intellectual impairment (21-24).

However, in humans, little is known about age-related modifications in the metabolism and signalling pathways of vitamin A and thyroid hormones. Vitamin A, and retinoic acid (RA) exert a wide variety of profound effects on growth, epithelial tissue differentiation, and homeostasis, and in maintaining an efficient immune status (25). RA is able to partly regulate gene expression through binding to specific nuclear receptors: Retinoic

Acid Receptors (RAR) or Retinoic X Receptors (RXR) (26). The RAR family ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) is activated by both all-trans RA and by 9-cis RA, whereas the RXR family ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) is exclusively activated by 9-cis RA. These nuclear proteins are DNA binding proteins, which belong to the superfamily of ligand-activated transcriptional regulators (27). Thyroid hormone nuclear receptors (TR $\alpha$  and TR $\beta$ ) are also members of the nuclear hormone receptor superfamily and regulate target genes in response to the T<sub>3</sub> ligand (triiodothyronine, the active form of thyroid hormones) (28, 29).

It has also been shown that RXR forms heterodimers with either RAR or TR in order to allow the regulation of gene transcription by interacting with distinct sequences in the promoter of target genes. Retinoids and thyroid hormone signalling pathways work in close relationship, particularly by means of RXR, which is the essential common partner for functional heterodimers for both pathways (30-32).

Studies performed in animals (rats and mice) have shown that aging is accompanied by hypo-activity of retinoid and thyroid signalling materialized by a hypo-expression of the nuclear receptors, RAR, RXR and TR, and observed in several organs (33, 34), which confirms that the drop in retinoid and thyroid states affects the entire organism.

Therefore, taken together, previous studies on the functional significance of retinoid and thyroid signalling have lead us to hypothesize that optimal maintenance of physiological processes requires precise regulation of the activation of these pathways. Moreover, aging also seems to lead to a decrease in the availability of RA and T<sub>3</sub> inside the cell, a decrease which would lead to hypo-expression of the nuclear receptors. This phenomenon, which has been demonstrated in animals, has not yet been observed in humans. Indeed, measurements of ROH, thyroid hormones and peripheral concentrations of TSH performed in elderly populations, do not reflect the intracellular availability of retinoic acid or thyroid hormones and thus the functional status of retinoid and thyroid signalling.

In order to assess the effects of aging on vitamin A and thyroid signalling pathways in humans, the expression of RAR $\alpha$ , RAR $\gamma$ , RXR $\alpha$ , TR $\alpha$  and TR $\beta$  in young *versus* healthy elderly subjects were compared. The amounts of their mRNA in a more approachable tissue, peripheral blood mononuclear cells (PBMC), were quantified



## **2. Subjects and methods**

### **2.1. Subjects**

Forty-six healthy men and women volunteers are recruited for this study: 22 (24-57 year-old) in the young group (YG) and 24 (69-90 year-old) in the elderly group (EG). Subjects of the YG were selected among volunteers according to their age, less than 60 years, and their health. We recruited only healthy subjects and tried to equilibrate the number of men and women in this group. The subjects of the EG were selected from a large cohort, the Three City (3C) Study. It is a collaborative research program based on a cohort of 9294 subjects aged 65 years and over recruited in three French cities. 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 of cognitive functioning and past and present consumption of tobacco, alcohol and drug use. Among several psychometric tests, the Mini Mental Score Examination (MMSE) score (35) was used to assess the cognitive performance of the subjects. At enrolment, neither young nor elderly subjects had chronic medical problems or illnesses associated with immune dysfunction. 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.

### **2.2. Health status**

Venous blood was collected from all subjects after overnight fasting ( $\approx 12$  h after previous meal). Diagnostic kits (RIA and IRMA, Immunotech, Marseille, France) were used to measure free plasma triiodothyronine (FT<sub>3</sub>), free thyroxin (FT<sub>4</sub>) and thyroid stimulating hormone (TSH) concentrations. The plasma retinol (ROH) concentration was determined by high-pressure liquid chromatography (HPLC) according to the method of Leclercq and Bourgeay-Causse (36). Plasma transthyretin (TTR) and retinol binding protein (RBP) concentrations were measured using an immuno-nephelometric process (Nephelometer Analyser II; Behring Diagnostics Inc., USA). Plasma total cholesterol (TC) and total triglyceride (TTG) concentrations were measured by an enzymatic method using a Synchron CX5 analyser (Beckman Coulter, USA). It has not been always possible to measure the plasma parameters for all the subjects.

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

Isolation of human (YG and EG) blood mononuclear cells was performed by density gradient centrifugation using Ficoll-Paque Plus solution (Amersham Biosciences, F-91898 Orsay Cedex, France). After overnight fasting, venous blood (5 ml) was drawn into an EDTA-coated vacutainer tube and layered onto 4 ml of Ficoll-Paque Plus solution and then centrifuged at 400g for 20 min at 20°C. PBMC were removed from the plasma-Ficoll interface, washed twice in a phosphate buffered solution (PBS 1M, pH 7.2) to remove platelets, Ficoll-Paque and plasma. PBMC were then suspended in TRIzol Reagent (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) for total RNA preparation.

PBMC from YG and EG were assayed simultaneously in all assays to ensure that differences between groups were indeed biological and not a result of inter-assay variation.

### **2.4. Quantification of mRNA expression**

#### 2.4.1. Total RNA preparation

Blood mononuclear cells were directly homogenized in 1 mL of TRIzol reagent solution and total RNA was extracted following the manufacturer's suggested protocol for small quantities of tissue. Purified RNA was quantified and assessed for purity by UV spectrophotometry. Average yield of total RNA extraction was not significantly different in PBMC from young and elderly subjects.

#### 2.4.2. Reverse transcription and analysis of gene expression

Reverse transcription and analysis of gene expression using a real time Polymerase Chain Reaction (PCR assay involving a Light Cycler<sup>TM</sup> technology) was carried out as described by Redonnet et al. (37) with minor modifications specific to the gene studied. The forward and reverse primer sequences are shown in Table 1. Specificity of primers was validated through the verification of RT-PCR product specificity. The identity of amplified products was verified by sequencing with the Dye Terminator Reaction Cycle Kit (Perkin-Elmer, Norwalk, CT) and analysed on an ABI PRISM<sup>TM</sup> 377 automated DNA sequencer (Perkin-Elmer).

Cyclophilin and porphobilinogen deaminase (PBGD) cDNA were used as housekeeping for the relative quantification of cDNA of RAR $\alpha$ , RXR $\alpha$ , TR $\alpha$  and RAR $\gamma$ , TR $\beta$  respectively. 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 level of the housekeeping genes was unaffected by aging. It has not been always possible to measure the relative amount of each nuclear receptor for all the subjects.

## 2.5. Statistical analysis

Data are expressed as means  $\pm$  SEM. All statistics were performed using Statgraphics Plus software. The statistical significance of differences between means was calculated by ANOVA followed by Student's *t*-test except for the TSH concentration for which Kruskal-Wallis test was employed because SD appeared to be different between the two groups. Linear regression was used to analyse the relationships between variables.

Statistical significance was accepted at  $P < 0.05$ .

**Table 1:** Primers used for LightCycler™ real-time PCR

PCR primer pair	Ref.	Sequence Sequences are shown for forward (F) and reverse (R) primers as well as size of amplicon	Position	Product Length (bp)
<b>PBGD</b>	68	F : 5'-TGCACGATCCCGAGACTCTGC-3' R : 5'-GCACGGCTACTGGCACACTGC-3'	743-763 812-832	90
<b>Cyclophilin</b>	69	F : 5'- TCCTAAAGCATAACGGGTCCTGGCAT-3' R : 5'- CGCTCCATGGCCTCCACAATATTCA-3'	280-304 421-445	165
<b>RAR<math>\alpha</math></b>	70	F : 5'-CTGCCAGTACTGCCGACTGC-3' R : 5'-ACGTTGTTCTGAGCTGTTGTTTCGTA-3'	519-538 729-753	235
<b>RAR<math>\gamma</math></b>	71	F : 5'-CTGCCAGTACTGCCGGCTAC-3' R : 5'-TCTGCACTGGAGTTCGTGGTATACT-3'	837-856 1040-1064	228
<b>RXR<math>\alpha</math></b>	72	F : 5'-CGACCCTGTCACCAACATTTGC-3' R : 5'-GAGCAGCTCATTCCAGCCTGCC-3'	861-882 981-1002	142
<b>TR<math>\alpha</math></b>	73	F : 5'-GTTCTAGATGACTCGAAGGCGGG-3' R : 5'-CTTCAGGAGTGGGCTCTGGTTCG-3'	838-860 935-956	119
<b>TR<math>\beta</math></b>	74	F : 5'-CCGAAGCACTGTCCAGACCGAGAAC-3' R : 5'-TCAAAGACTTCCAAGAAGAGAGGC-3'	334-358 399-423	90

### **3. Results**

The sample studied was composed of 16 men and 30 women. At inclusion, the mean age was 35.5 years (SD=11.3) for the young group (YG) and of 75.1 years (SD=6.2) for the elderly group (EG). The young group included 12 (54%) women and 10 (45%) men. Among the elderly subjects, 18 (75%) were women and 6 (25%) were men (Table 2). Several biological characteristics were different between the young and elderly, particularly the lipid parameters. As shown in Table 3, total cholesterol and total triglyceride concentrations were significantly increased in the plasma of elderly subjects in comparison with the young, although the values remained within the laboratory reference range.

**Table 2:** Distribution of participants by gender and age

Gender	Young Group		Elderly Group	
	n	Age (year)	n	Age (year)
Males	10 (45) <sup>a</sup>	34.9 ± 12.1 <sup>b</sup>	6 (25)	76.5 ± 6.5
Females	12 (54)	36.1 ± 11.0	18 (75)	70.8 ± 1.9
<b>Total</b>	22	35.5 ± 11.3	24	75.1 ± 6.2
Range		24-57		69-90

<sup>a</sup> Numbers in parentheses represent percent of total.

<sup>b</sup> Means ± SD.

### **3.1. Retinoid status**

Serum retinol (ROH) concentration was measured in order to characterize the vitamin A status of the subjects. No significant difference was observed between YG and EG. The variation in plasma retinol binding protein (RBP) concentration, proposed as a simple surrogate measure for vitamin A assessment (38, 39), was not different in EG as compared to YG. These two parameters were, moreover, within the laboratory reference values, which indicated that all the subjects exhibited a normal nutritional status (Table 3).

The calculation of the retinol binding protein to transthyretin molar ratio (RBP:TTR) has been proposed as an indirect method for vitamin A assessment (40, 41). In this study, this ratio was significantly higher in EG than in YG (+16%). TTR or prealbumin measurement was used as an indicator of the nutritional status. As shown in Table 3, the plasma TTR concentration was lower in EG as compared to YG (-15%).

Several subtypes of retinoid receptors were found expressed in the human PBMC. The relative expression of mRNA of RAR $\alpha$ , RAR $\gamma$  and RXR $\alpha$  are given to assess the intracellular functions of the retinoids. No significant difference was found between young and elderly subjects except for the RAR $\gamma$  isoform, the mRNA amount of which was significantly reduced in the PBMC of EG as compared to YG (-16%) (Table 4).

### **3.2. Thyroid status**

Thyroid status of subjects of each group was classically assessed by measurement of free triiodothyronine (FT<sub>3</sub>), free thyroxine (FT<sub>4</sub>) and thyroid stimulating hormone (TSH) in the plasma. Among the three parameters, TSH was the only one which exhibited a significant difference between the two groups, + 39% in the elderly compared to the young while remaining within the laboratory reference range (Table 3).

The relative expression of thyroid receptors, TR $\alpha$  and TR $\beta$  subtypes expressed in PBMC, was measured in order to describe the intracellular function of the thyroid hormones. The amount of both TR $\alpha$  and TR $\beta$  mRNA were found to be significantly reduced in the EG as compared to the YG (-13% and -18% respectively) (Table 4).

**Table 3:** Plasma concentration of vitamin A, thyroid hormones and transport proteins in young and elderly groups

	Laboratory reference range	Young Group (total n =22)		Elderly Group (total n=24)	
		mean $\pm$ s.e.m. (n)	range	mean $\pm$ s.e.m. (n)	range
<b>Retinol</b> ( $\mu\text{mol/L}$ )	1.5-3	2.09 $\pm$ 0.08 (20)	1.5-2.6	2.16 $\pm$ 0.09 (23)	1.6-3.1
<b>RBP</b> ( $\mu\text{mol/L}$ )	1.7-2.9	2.03 $\pm$ 0.09 (19)	1.4-2.7	2.05 $\pm$ 0.07 (21)	1.6-2.9
<b>RBP:TTR</b> (mol/mol)	-	0.38 $\pm$ 0.01 (19)	0.27-0.47	0.44 $\pm$ 0.01* (21)	0.36-0.51
<b>TTR</b> ( $\mu\text{mol/L}$ )	3.6-7.3	5.42 $\pm$ 0.18 (19)	4.0-6.9	4.63 $\pm$ 0.16* (24)	3.3-6.4
<b>FT<sub>3</sub></b> (pmol/L)	2.5-5	3.65 $\pm$ 0.09 (22)	2.9-4.3	3.44 $\pm$ 0.08 (23)	2.9-4.4
<b>FT<sub>4</sub></b> (pmol/L)	10-20	14.07 $\pm$ 0.26 (22)	11.7-16.4	13.32 $\pm$ 0.32 (24)	10.6-16.6
<b>TSH</b> ( $\mu\text{UI/ml}$ )	0.35-3.50	1.77 $\pm$ 0.15 (20)	0.9-3.8	2.46 $\pm$ 0.28* (23)	0.1-4.7
<b>TC</b> (mmol/L)	4-6.2	4.96 $\pm$ 0.19 (21)	3.8-7.2	5.59 $\pm$ 0.20* (23)	3.9-7.3
<b>TTG</b> (mmol/L)	0.3-1.8	0.77 $\pm$ 0.07 (21)	0.3-1.3	1.07 $\pm$ 0.09* (24)	1.4-1.8

Statistical analyses were performed using ANOVA followed by Student's *t* test.

\*Significantly different from young group,  $P < 0.05$ .

**Table 4:** Effect of aging on the relative expression of RA and T<sub>3</sub> nuclear receptors in human PBMC

	Young Group (total n=22)		Elderly Group (total n=24)	
	mean ± s.e.m (n)	range	mean ± s.e.m. (n)	range
<b>RAR<math>\alpha</math></b> (%Cyclophilin)	35.9 ± 2.1 (16)	22-46	31.6 ± 1.5 (23)	20-44
<b>RAR<math>\gamma</math></b> (%PBGD)	193.1 ± 12.7 (16)	111-283	162.1 ± 6.9 * (21)	100-217
<b>RXR<math>\alpha</math></b> (%Cyclophilin)	25.2 ± 1.1 (12)	20-30	28.7 ± 1.4 (22)	20-47
<b>TR<math>\alpha</math></b> (%Cyclophilin)	4.9 ± 0.2 (18)	3.5-6.8	4.3 ± 0.1 * (21)	3.2-5.3
<b>TR<math>\beta</math></b> (%PBGD)	12.6 ± 0.6 (14)	9.1-16.2	10.3 ± 0.6 * (23)	6.2-14.8

Statistical analyses were performed using ANOVA followed by Student's *t* test.

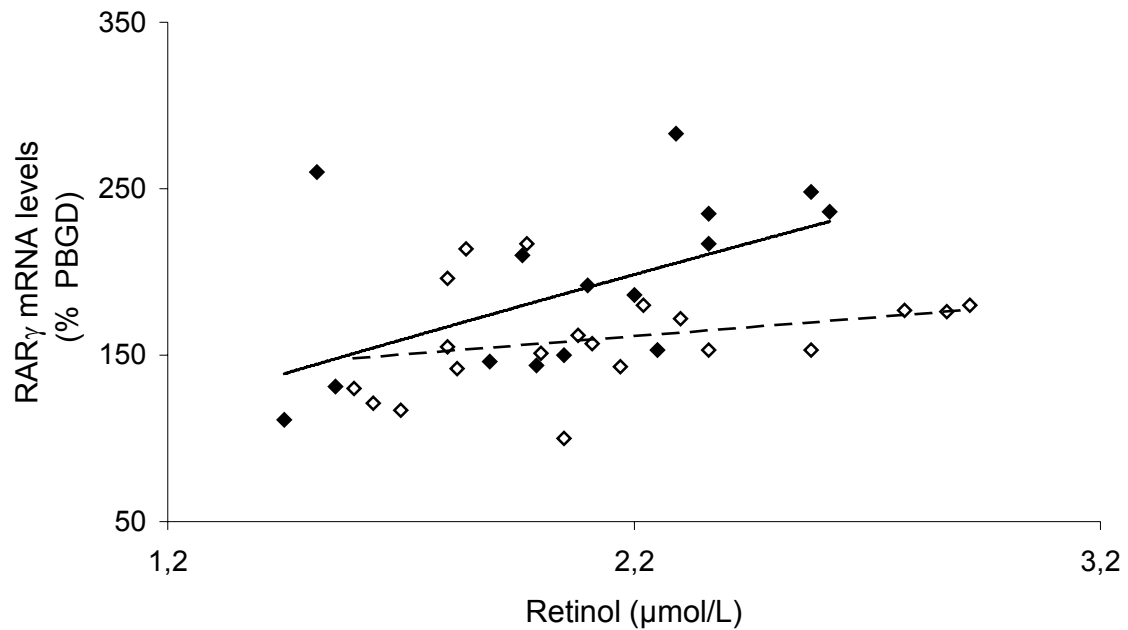
\*Significantly different from young group,  $P < 0.05$ .

### 3.3. Correlations between plasma parameters and the relative expression of nuclear receptors

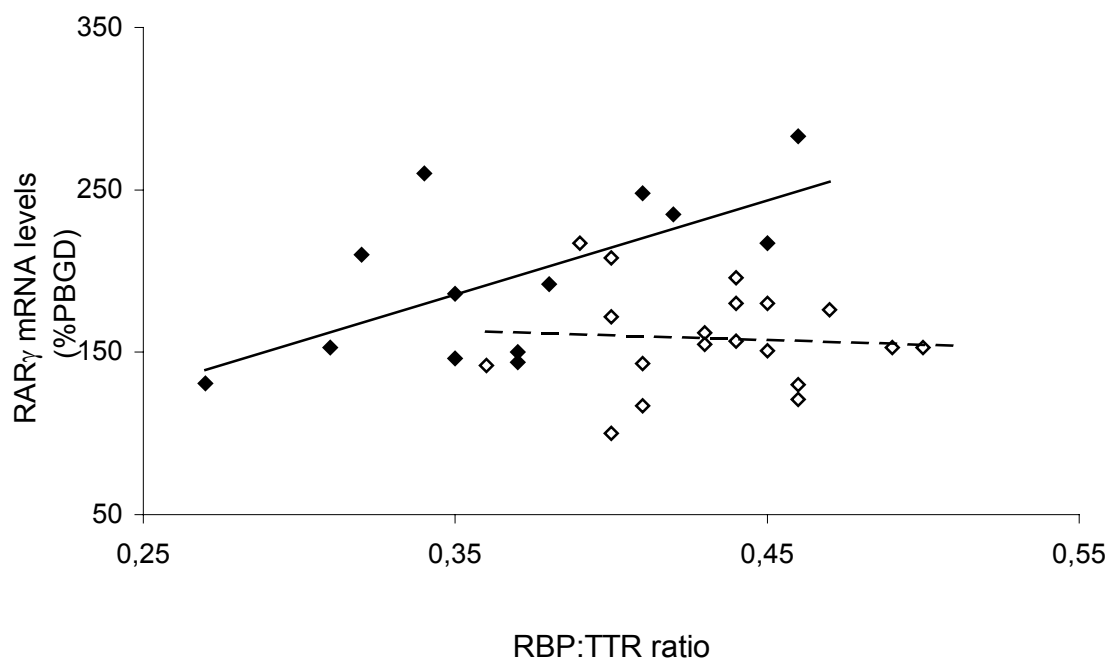
Different correlations between the ROH, RBP, RBP:TTR ratio and the expression of the RAR $\alpha$ , RAR $\gamma$  or RXR $\alpha$  in the PBMC were considered. As shown in Figure 1, the expression of RAR $\gamma$  mRNA was positively correlated, on one hand, to the ROH concentration in the YG ( $r = 0.52$ ,  $P = 0.045$ ) and on the other hand, to the RBP:TTR ratio of the YG ( $r = 0.64$ ,  $P = 0.018$ ). No similar associations were observed in the EG.

Likewise, close relationships between FT<sub>3</sub>, FT<sub>4</sub>, TSH and TR $\alpha$  or TR $\beta$  were considered. A significant positive correlation between the FT<sub>3</sub> concentration and the expression of TR $\beta$  mRNA was found in the YG ( $r = 0.60$ ,  $P = 0.022$ ) but not in the EG. Interestingly, the RBP:TTR ratio and the TR $\beta$  expression were significantly and negatively associated in the YG ( $r = -0.62$ ,  $P = 0.031$ ) but not in the EG (Fig. 2).

(A)



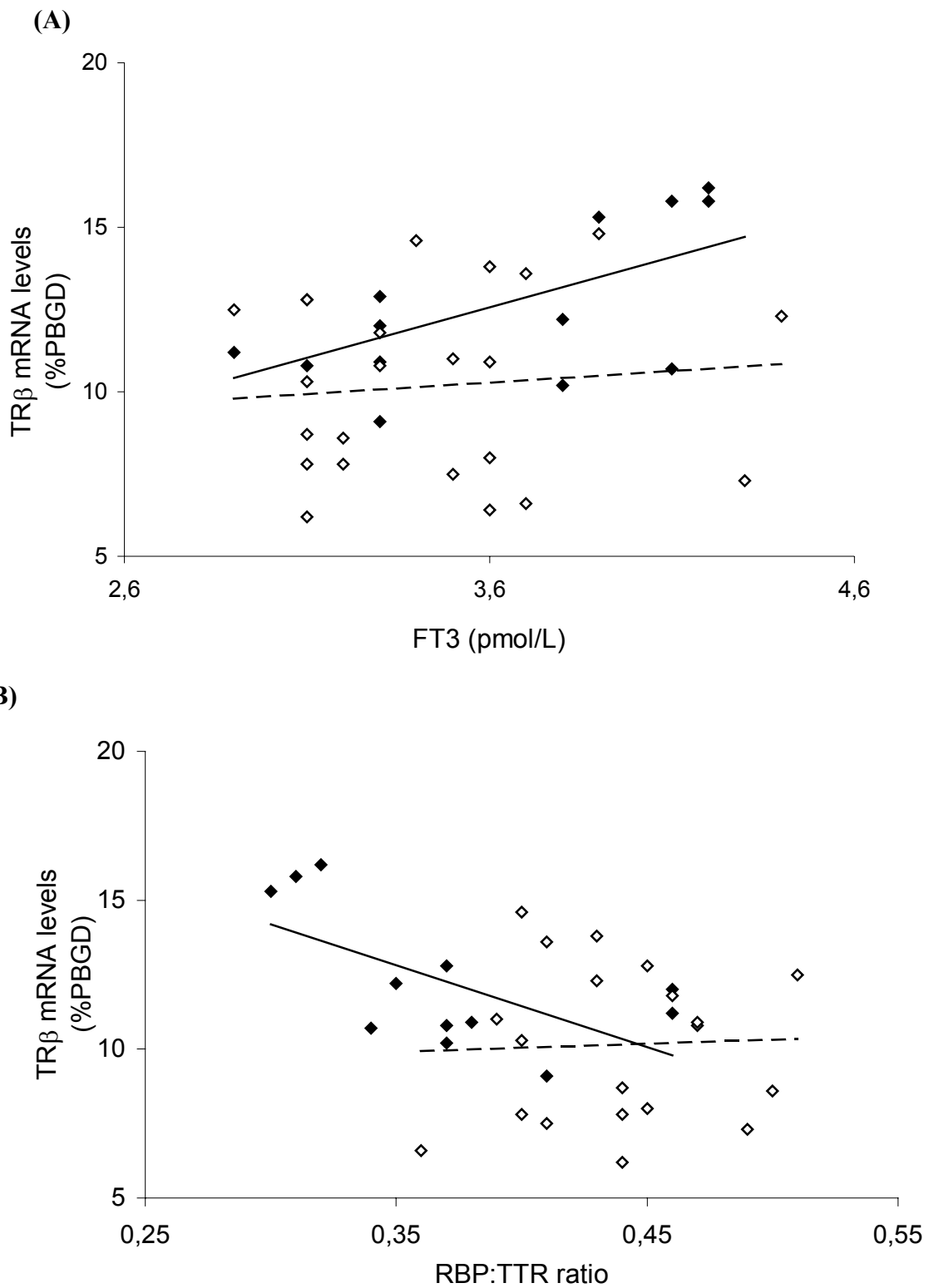
(B)



**Figure 1**

Correlation between RAR $\gamma$  mRNA level in the PBMC and retinol concentration (A) in young ( $\blacklozenge$   $n = 15$ ;  $r = 0.52$ ,  $P = 0.045$ ) and elderly subjects ( $\diamond$   $n = 20$ ;  $r = 0.38$ ,  $P = 0.08$ ) or RBP:TTR ratio (B) in young ( $\blacklozenge$   $n = 13$ ;  $r = 0.64$ ,  $P = 0.018$ ) and elderly group ( $\diamond$   $n = 19$ ;  $r = -0.07$ ,  $P = 0.78$ )





**Figure 2**

Correlation between TRβ mRNA level in the PBMC and FT<sub>3</sub> concentration (A) in young (◆ n = 14; r = 0.60, P = 0.022) and elderly group (◇ n = 22; r = 0.10, P = 0.66) or RBP:TTR ratio (B) in young (◆ n = 13; r = -0.62, P = 0.031) and elderly subjects (◇ n = 19; r = 0.04, P = 0.87)

#### **4. Discussion**

Aging is a variable but tightly programmed biological phenomenon. Little is known as to why and how we age. Elucidation of the mechanism of aging and age-associated disorders is one of the highest priorities in industrialised countries. Knowing the extensive role of the retinoid and thyroid pathways in the physiology of adults and the elderly, particularly in the brain, the purpose of this study was to determine whether the abundance of retinoid and thyroid nuclear receptor isoforms is modified by aging in human PBMC.

#### **Retinoid status**

In the present study, elderly people when compared to the young did not exhibit any difference in the plasma parameters which traditionally characterise vitamin A status, namely the concentrations of retinol (ROH) and the Retinol Binding Protein (RBP) (38, 39). This situation has been previously observed (15, 42). The present study differs, however, from some others which have shown a higher retinol concentration in older subjects (9), or a gradual, linear increase in the average concentration of retinol with age (43); and others which have described age-related reduction in plasma retinol concentration (11, 13). Here, in young as well as elderly subjects, the ROH concentration correlated very well with the RBP concentration ( $r = 0.80$ ,  $P < 0.0001$ ). This is consistent with the 1:1 molar complex between RBP and ROH in plasma (44). Moreover, no subjects had a fasting plasma retinol concentration under  $1.4 \mu\text{mol/l}$ , a threshold assumed to indicate a moderate risk of vitamin A deficiency (45). The unimpaired vitamin A status of the subjects was confirmed by a RBP:TTR molar ratio higher than 0.37 in the entire population studied (young and elderly). This cut-off point (RBP:TTR = 0.37) was proposed in order to assess vitamin A deficiency in adult and children (40, 41).

Interestingly, the present data constitute the first observation of an age-related increase in this ratio, the meaning of which remains uncertain. The variation in the ratio with age may be attributed, at least in part, to the decrease in the TTR concentration in EG as compared to YG. Ingenbleek and De Visscher (46) have already shown such an age-dependent decrease in TTR after 50 years of age. Robbins et al. (47) furthermore affirmed that the TTR concentration in plasma must be considered as a sensitive indicator of malnutrition and illness owing to a reduction in its production rate in combination with its very rapid rate of disappearance from the circulation. However, the TTR concentration in YG and EG remained within the laboratory reference limits.

Moreover, the ROH concentration was well correlated with the RBP:TTR ratio in the young subjects ( $r = 0.59$ ,  $P = 0.008$ ), which confirmed that it is a good indicator of vitamin A status in adults. This correlation slightly decreased with aging ( $r = 0.48$ ,  $P = 0.031$ ).

#### *Retinoid nuclear receptors expression*

In this study, the quantification of the expression of the retinoid nuclear receptors, which constitutes a reliable approach of the real bioavailability of retinoids at the nuclear level in PBMC was promoted. The results demonstrated that, even though RAR $\alpha$  and RXR $\alpha$  expression was not significantly changed in PBMC with aging, it tends to change toward down-regulation for RAR $\alpha$  and to up-regulation for RXR $\alpha$ . The RAR $\gamma$  expression was significantly reduced in the PBMC of elderly subjects relative to young. These data constitute the first evidence of hypo-activation of the retinoid pathway in the elderly. Moreover, although it was possible to show a strong correlation between the ROH concentration and RAR $\gamma$  expression in young people ( $r = 0.52$ ,  $P = 0.045$ ), this correlation abated with aging ( $r = 0.38$ ,  $P = 0.08$ ). Similarly, RAR $\gamma$  expression was closely related to the RBP:TTR ratio in the young but not in the elderly. It would seem that the potential association between the peripheral markers of vitamin A status and the retinoid function was no longer feasible in older people. This may indicate that aging modifies the nuclear bioavailability of retinoic acid, leading to an alteration in the function of the retinoid pathway not perceptible by measuring plasma parameters. Additionally, use of gene expression assays to assess vitamin A status instead of more classical analysis methods has already been proposed by Furr (48).

#### **Thyroid status**

The endocrine system is often referred to as being affected by aging, because age alters the function of many endocrine glands, including the thyroid gland (49). As has been previously observed (15, 50), in the present study, free serum T<sub>4</sub> and T<sub>3</sub> decreased slightly but not significantly with aging. Concurrently, serum TSH level rose significantly (+39%) even if it remained within the laboratory reference range. These results were in agreement with previous studies of Ravaglia et al. (15) and Hollowell et al. (10) (NHANES III), who reported that TSH and the prevalence of anti-thyroid antibodies increases with age. Serum TSH responds with amplification to minor alterations in T<sub>3</sub> and T<sub>4</sub>. Thus elevation of TSH, even when inside normal laboratory values, probably indicates that T<sub>3</sub> and T<sub>4</sub> were modified. Samuels (51) and Andersen et al. (52) reported that many older patients have abnormal TSH

levels without other alterations in serum thyroid hormone levels, conditions they termed subclinical hypothyroidism. The present results were coherent with this thyroid status, which is difficult to diagnosis because symptoms are subtle and very often attributed to normal aging (53). The intra-subject variability in TSH concentrations suggests another consequence of the aging process: the increased physiological heterogeneity of elderly subjects (54). The significant decrease in the TTR concentration observed in the elderly agreed with the idea that alterations of thyroid status occurs with aging in that TTR is a plasmatic protein that binds and carries the thyroid hormones in the circulating system (55). The increased TSH concentration was probably a sign of subtle dysfunction in the regulation of the thyroid hormone production occurring with advancing age. Moreover, as previously described, hypothyroidism is frequently associated with an elevation in serum cholesterol and triglycerides (56) explaining perhaps, at least in part, the observation of an increase in serum cholesterol and triglycerides in the elderly in this study. The age-related increase in TC concentration could be associated with the down-regulation of the thyroid status in the elderly in that the regulation of cholesterol metabolism was  $T_3$ -dependent (57, 58). Indeed, Efstathiadiou et al. (59) have reported that the composition and transport of lipoproteins are disturbed in thyroid diseases.

#### *Expression of thyroid nuclear receptors*

Measurement of the expression of thyroid nuclear receptors at the mRNA level, in PBMC, confirmed that irregularities in thyroid function take place with aging. Indeed,  $TR\beta$  and, to a lesser extent,  $TR\alpha$  were significantly decreased in the elderly as compared to young subjects.

The  $TR\beta$  receptors are the most potent regulators of TSH production (60). Thus the decreased expression of  $TR\beta$  could explain, in part, the increase in TSH concentration in the elderly. Thyroid hormone regulation of nuclear TR in human lymphocytes has already been demonstrated by Li et al. (61). Sadow et al. (62) have reported that TR isoforms are auto-regulated transcription factors that function in a tissue specific manner.  $TR\alpha$  and  $TR\beta$  subtypes can mediate an opposite response to thyroid hormones. The present results underscore the good correlation between free  $T_3$  in the plasma and the amount of mRNA of  $TR\beta$ , but not  $TR\alpha$ , in the young group ( $r = 0.60$ ,  $P = 0.022$ ), which vanished in the elderly ( $r = 0.1$ ,  $P = 0.66$ ). A similar relationship, which disappeared in the elderly, existed in the young group between the molar ratio RBP:TTR and the abundance of  $TR\beta$  mRNA (YG :  $r = -0.62$ ,  $P$

= 0.03 ; EG :  $r = 0.04$ ,  $P = 0.87$ ). Together, all these results suggest that the decreased expression of TR is the result of an age-related reduction of the bioavailability of thyroid hormones, particularly  $T_3$ , at the nuclear level. As we have already suggested for the retinoid pathway, this phenomenon would lead to hypo-activation of the nuclear thyroid pathway.

### **Conclusion**

Precedent studies performed in animals have emphasized that aging leads to hypo-expression of the nuclear retinoid and thyroid pathways. This phenomenon has been observed in several animal tissues indicating that the thyroid and retinoid statuses collapse with aging, in the entire organism (33, 34).

Results obtained in the present study, concerning PBMC, are the first evidence for a comparable phenomenon in humans. Indeed, the age-related hypo-expression of retinoid and thyroid nuclear receptors, in PBMC, indicates a global collapse of the retinoid and thyroid statuses and consequently hypo-expression in other tissues and organs as well. Among these, the brain is particularly exposed. Indeed; it has been shown in animals that retinoid as well as thyroid status modulate the plasticity of the adult brain (24, 63) and that their age-associated alteration induces cognitive impairment (64). Moreover, high serum TSH level has been associated with depression in the elderly (65) and hypothyroidism is well known to induce cognitive impairment and dementia (66, 67). The role of retinoids in brain aging seems of first importance itself, in that evidence for defective retinoid transport and function in late onset Alzheimer's disease has been published (16). Thus it remains to be determined whether small abnormalities in thyroid and retinoid nuclear receptor expression such as those induced by aging in PBMC are important for brain function.

### **Acknowledgements**

The authors wish to thank K. Mayo for English revision.

### **5. References**

1. Schneider G. 1999 Aging in the Third Millenium. *Science* 283
2. Maggi S, Zucchetto M, Grigoletto F, Baldereschi M, Candelise L, Scarpini E, Scarlato G, Amaducci L. The Italian Longitudinal Study on Aging (ILSA): design and methods. *Aging (Milano)* 1994 6 464-73.
3. Alperovitch A, Amouyel P, Dartigues JF, Ducimetiere P, Mazoyer B, Ritchie K, Tzourio C. Epidemiological studies on aging in France: from the PAQUID study to the Three-City study. *Comptes rendus biologie* 2002 325 665-72.

4. Partridge L, Gems D. Mechanisms of aging: public or private? *Nature Reviews. Genetics* 2002 3 165-75.
5. Troen BR. The biology of aging. *The Mount Sinai journal of medicine, New York.*2003 70 3-22.
6. Ferrucci L, Cavazzini C, Corsi A, Bartali B, Russo CR, Lauretani F, Ferrucci L, Cavazzini C, Corsi AM, Bartali B, Russo CR, Lauretani F, Bandinelli S, Bandinelli S, Guralnik JM. Biomarkers of frailty in older persons. *Journal of Endocrinological Investigation* 2002 25(10 Suppl) 10-5.
7. Bonnefoy M, Draï J, Kostka T. Antioxidants to slow aging, facts and perspectives. *Presse Medicale.* 2002 31 1174-84.
8. Azais-Braesco V, Winklhofer-Roob B, Ribalta J, Hanley B, Vasson MP, Brtko J, Brigeluis-Flohe R, Bronner A. Vitamin A, vitamin E and carotenoid status and metabolism during aging: functional and nutritional consequences (project proposal). *Endocrine Regulations.* 2000 34 97-8.
9. Mecocci P, Polidori MC, Troiano L, Cherubini A, Cecchetti R, Pini G, Straatman M, Monti D, Stahl W, Sies H, Franceschi C, Senin U. Plasma antioxidants and longevity: a study on healthy centenarians. *Free Radical Biology and Medicine.* 2000 28 1243-8.
10. Hollowell JG, Staehling NW, Flanders WD, Hannon WH, Gunter EW, Spencer CA, Braverman LE. Serum TSH, T(4), and thyroid antibodies in the United States population (1988 to 1994): National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2002 87 489-99.
11. Borel P, Mekki N, Boirie Y, Partier A, Alexandre-Gouabau MC, Grolier P, Beaufre B, Portugal H, Lairon D, Azais-Braesco V. Comparison of the postprandial plasma vitamin A response in young and older adults. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences* 1998 53 B133-40.
12. 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. *Journal of cardiovascular pharmacology* 2004 43 26-30.
13. Haller J, Weggemans RM, Lammi-Keefe CJ, Ferry M. Changes in the vitamin status of elderly Europeans: plasma vitamins A, E, B-6, B-12, folic acid and carotenoids. SENECA Investigators. *European Journal of Clinical Nutrition.* 1996 50 (Suppl 2) S32-46.
14. Finucane P, Anderson C. Thyroid disease in older patients. Diagnosis and treatment. *Drugs Aging* 1995 6 268-77.
15. Ravaglia G, Forti P, Maioli F, Nesi B, Pratelli L, Savarino L, Cucinotta D, Cavalli G. Blood micronutrient and thyroid hormone concentrations in the oldest-old. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2000 85 2260-5.
16. Goodman AB, Pardee AB. Evidence for defective retinoid transport and function in late onset Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA.* 2003 100 2901-5.
17. Diez JJ. Hypothyroidism in patients older than 55 years: an analysis of the etiology and assessment of the effectiveness of therapy. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences* 2002 57 M315-20.
18. Diez JJ. Hyperthyroidism in patients older than 55 years: an analysis of the etiology and management. *Gerontology* 2003 49 316-23.
19. Leitol H, Behrends J, Brabant G. The thyroid axis in aging. *Novartis Found Symposium* 2002 242 193-201.
20. Chuo AM, Lim JK. Thyroid dysfunction in elderly patients. *Annals of the Academy of Medicine, Singapore.* 2003 32 96-100.
21. Fukui T, Hasegawa Y, Takenaka H. Hyperthyroid dementia: clinicoradiological findings and response to treatment. *Journal of the Neurological Sciences* 2001 184 81-88.

22. Constant EL, de Volder AG, Ivanoiu A, Bol A, Labar D, Seghers A, Cosnard G, Melin J, Daumerie C. Cerebral blood flow and glucose metabolism in hypothyroidism: a positron emission tomography study. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2001 86 3864-70.
23. Smith JW, Evans AT, Costall B, Smythe JW. Thyroid hormones, brain function and cognition: a brief review. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 2002 26 45-60.
24. Bernal J. Action of thyroid hormone in brain. *Journal of Endocrinological Investigation* 2002 25 268-88.
25. Sporn MB, Roberts, AB, Goodman D. The Retinoids: Biology, Chemistry, and Medicine. *In Press, R.ed. New York.* 1994
26. Marill J, Idres N, Capron CC, Nguyen E, Chabot GG. Retinoic acid metabolism and mechanism of action: a review. *Current Drug Metabolism* 2003 4 1-10.
27. Aranda A, Pascual A. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiological Reviews* 2001 81 1269-304.
28. Yen PM. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiological Reviews* 2001 81 1097-142.
29. Viguerie N, Langin D. Effect of thyroid hormone on gene expression. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 2003 6 377-81.
30. Schrader M, Carlberg C. Thyroid hormone and retinoic acid receptors form heterodimers with retinoid X receptors on direct repeats, palindromes, and inverted palindromes. *DNA and Cell Biology* 1994 13 333-41.
31. Mangelsdorf DJ, Evans R.M. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 1995 83 841-50.
32. Li D, Li T, Wang F, Tian H, Samuels HH. Functional evidence for retinoid X receptor (RXR) as a nonsilent partner in the thyroid hormone receptor/RXR heterodimer. *Molecular and Cellular Biology* 2002 22 5782-92.
33. 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. *Mechanisms of Ageing and Development* 1997 99 123-36.
34. Enderlin V, Pallet V, Alfos 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. *Neuroscience Letters* 1997 229 125-9.
35. Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *Journal of Psychiatric Research* 1975 12 189-98.
36. Leclercq M, Bourgeay-Causse M. A simple, reliable fast method: simultaneous proportioning of retinol and serum tocopherol by high performance liquid chromatography. *Revue Institut Pasteur Lyon* 1981 14 475-496.
37. Redonnet A, Bonilla S, Noel-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. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders* 2002 26 920-7.
38. Almekinder J, Manda W, Soko D, Lan Y, Hoover DR, Semba RD. Evaluation of plasma retinol-binding protein as a surrogate measure for plasma retinol concentrations. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 2000 60 199-203.
39. de Pee S, Dary O. Biochemical indicators of vitamin A deficiency: serum retinol and serum retinal binding protein. *Journal of Nutrition* 2002 132 2895S-2901S.

40. 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. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 2002 40 1301-7.
41. Rosales FJ, Chau KK, Haskell MH, Shankar AH. Determination of a cut-off value for the molar ratio of retinol-binding protein to transthyretin (RBP:TTR) in Bangladeshi patients with low hepatic vitamin A stores. *Journal of Nutrition* 2002 132 3687-92.
42. Gardner EM, Bernstein ED, Dorfman M, Abrutyn E, Murasko DM. The age-associated decline in immune function of healthy individuals is not related to changes in plasma concentrations of beta-carotene, retinol, alpha-tocopherol or zinc. *Mechanisms of Ageing and Development* 1997 94 55-69.
43. Garry PJ, Hunt WC, Bandrofchak JL, VanderJagt D, Goodwin JS. Vitamin A intake and plasma retinol levels in healthy elderly men and women. *American Journal of Clinical Nutrition* 1987 46 989-94.
44. Goodman DS. Plasma retinol-binding protein. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1980 348 378-90.
45. Hercberg S, Preziosi P, Galan P, Devanlay M, Keller H, Bourgeois C, Potier de Courcy G, Cherouvrier F. Vitamin status of a healthy French population: dietary intakes and biochemical markers. *International journal for vitamin and nutrition research* 1994 64 220-32.
46. Ingenbleek Y, De Visscher M. Hormonal and nutritional status: critical conditions for endemic goiter epidemiology? *Metabolism* 1979 28 9-19.
47. Robbins J. Transthyretin from discovery to now. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 2002 40 1183-90.
48. Furr HC. Analysis of retinoids and carotenoids: problems resolved and unsolved. *Journal of Nutrition* 2004 134 281S-285S.
49. Corrêa da Costa VM, Moreira DG, Rosenthal D. Thyroid function and aging: gender-related differences. *The Journal of Endocrinology* 2001 171 193-8.
50. 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* 2002 51 105-9.
51. Samuels MH. Subclinical thyroid disease in the elderly. *Thyroid* 1998 8 803-13.
52. Andersen S, Bruun NH, Pedersen KM, Laurberg P. Biologic variation is important for interpretation of thyroid function tests. *Thyroid* 2003 13 1069-78.
53. Mohandas R, Gupta KL. Managing thyroid dysfunction in the elderly. Answers to seven common questions. *Postgraduate Medicine* 2003 113 54-6.
54. Evans JG. Aging and disease. *Ciba Found Symposium* 1988 134 38-57.
55. Schreiber G. The evolutionary and integrative roles of transthyretin in thyroid hormone homeostasis. *The Journal of Endocrinology* 2002 175 61-73.
56. Duntas LH. Thyroid disease and lipids. *Thyroid* 2002 12 287-93.
57. Gullberg H, Rudling M, Forrest D, Angelin B, Vennstrom B. Thyroid hormone receptor beta-deficient mice show complete loss of the normal cholesterol 7alpha-hydroxylase (CYP7A) response to thyroid hormone but display enhanced resistance to dietary cholesterol. *Molecular Endocrinology* 2000 14 1739-49.
58. Macchia PE, Takeuchi Y, Kawai T, Cua K, Gauthier K, Chassande O, Seo H, Hayashi Y, Samarut J, Murata Y, Weiss RE, Refetoff S. Increased sensitivity to thyroid hormone in mice with complete deficiency of thyroid hormone receptor alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 2001 98 349-54.
59. Efstathiadou Z, Bitsis S, Milionis HJ, Kukuvtis A, Bairaktari ET, Elisaf MS, Tsatsoulis A. Lipid profile in subclinical hypothyroidism: is L-thyroxine substitution beneficial? *European Journal of Endocrinology* 2001 145 705-10.



60. Gauthier K, Chassande O, Plateroti M, Roux JP, Legrand C, Pain B, Rousset B, Weiss R, Trouillas J, Samarut J. Different functions for the thyroid hormone receptors TRalpha and TRbeta in the control of thyroid hormone production and post-natal development. *The EMBO Journal* 1999 18 623-31.
61. Li DQ, Kuang AK, Ding T, Chen JL, Xu MY. Nuclear 3,5,3'-triiodothyronine receptors (T3R) of circulating human lymphocytes in hyper- and hypothyroidism and nonthyroidal diseases. *Chinese Medical Journal (Engl)* 1990 103 355-8.
62. Sadow PM, Chassande O, Koo EK, Gauthier K, Samarut J, Xu J, O'Malley BW, Weiss RE. Regulation of expression of thyroid hormone receptor isoforms and coactivators in liver and heart by thyroid hormone. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2003 203 65-75.
63. Husson M, Enderlin V, Alfos S, Féart 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. *British Journal of Nutrition* 2003 90 191-98.
64. 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 signalling. *Journal of Neurosciences* 2001 21 6423-9.
65. Chueire VB, Silva ET, Perotta E, Romaldini JH, Ward LS. High serum TSH levels are associated with depression in the elderly. *Archives of Gerontology and Geriatrics* 2003 36 281-8.
66. Manciet G, Dartigues JF, Decamps A, Barberger-Gateau P, Letenneur L, Latapie MJ, Latapie JL. The PAQUID survey and correlates of subclinical hypothyroidism in elderly community residents in the southwest of France. *Age Aging* 1995 24 235-41.
67. Davis JD, Stern RA, Flashman LA. Cognitive and neuropsychiatric aspects of subclinical hypothyroidism: significance in the elderly. *Current Psychiatry Reports* 2003 5 384-90.
68. Raich N, Romeo PH, Dubart A, Beaupain D, Cohen-Solal M, Goossens M. Molecular cloning and complete primary sequence of human erythrocyte porphobilinogen deaminase. *Nucleic Acids Research* 1986 14 5955-68.
69. Haendler B, Hofer-Warbinek R, Hofer E. Complementary DNA for human T-cell cyclophilin. *The EMBO Journal*. 1987 6 947-50.
70. Giguere V, Ong ES, Segui P, Evans RM. Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid. *Nature* 1987 330 624-629.
71. Krust A, Kastner P, Petkovich M, Zelent A, Chambon P. A third human retinoic acid receptor, hRAR-gamma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 1989 86 5310-5314.
72. Mangelsdorf DJ, Ong ES, Dyck JA, Evans RM. Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway. *Nature* 1990 345 224-29.
73. Laudet V, Begue A, Henry-Duthoit C, Joubel A, Martin P, Stehelin D, Saule S. Genomic organization of the human thyroid hormone receptor alpha (c-erbA-1) gene. *Nucleic Acids Research* 1991 19 1105-1112.
74. Weinberger C, Thompson CC, Ong ES, Lebo R, Gruol DJ, Evans RM. The c-erb-A gene encodes a thyroid hormone. *Nature* 1986 324 641-646.



### **I.3. CONCLUSION**

L'objectif de cette étude était de déterminer les conséquences du vieillissement sur l'expression des récepteurs nucléaires des rétinoïdes et de la T3 dans les cellules mononucléées du sang chez l'homme. Les résultats obtenus montrent, pour la première fois, que l'âge induit, chez l'homme, des altérations de la fonctionnalité des voies de signalisation des rétinoïdes et des HT dans les PBMC. Ils sont à rapprocher de ceux que nous avons obtenus chez l'animal qui mettent en évidence un phénomène comparable dans le cerveau, et le foie (Pallet et al., 1997 ; Enderlin et al., 1997a,b ; Publication 2). Dans l'ensemble, ces études confortent notre hypothèse selon laquelle l'organisme âgé serait tout entier concerné par les altérations inexorables de ces voies de signalisation, les conséquences fonctionnelles d'un tel phénomène dépendant du tissu considéré. Dans ce contexte, le profil d'expression des récepteurs nucléaires des cellules mononucléées, compartiment cellulaire aisément accessible, se révélerait un indicateur tout à fait pertinent de la fonctionnalité des voies d'action nucléaires des rétinoïdes et des HT d'un sujet. Ceci pourrait être d'un intérêt considérable (i) si l'on considère les résultats montrant l'importance de ces voies dans le cerveau et l'étiologie des processus cognitifs (Etchamendy et al., 2001) ; (ii) si l'on prend en compte les données de la littérature qui soutiennent que la diminution de la biodisponibilité de l'AR est à l'origine des formes tardives de la maladie d'Alzheimer (Goodman et Pardee, 2003) et (iii) si l'on admet qu'il est aujourd'hui impossible de mesurer l'expression des récepteurs nucléaires dans le cerveau des sujets.

Suite à nos résultats expérimentaux, et aux résultats de cette étude biomédicale, dans la suite de notre travail nous avons choisi d'étudier, chez l'homme, les conséquences d'une hypothyroïdie sur l'expression des récepteurs nucléaires des rétinoïdes et des HT dans les cellules mononucléées du sang.



## **II. EXPRESSION DES RECEPTEURS NUCLEAIRES DE LA TRIIODOTHYRONINE ET DE L'ACIDE RETINOÏQUE DANS LES CELLULES MONONUCLEES DU SANG CHEZ DES SUJETS HYPOTHYROÏDIENS**

L'hypothyroïdie, dont la prévalence augmente avec l'âge, touche environ 4,5% de la population générale et le plus souvent les femmes (Tunbridge et al., 1977, revue dans Roberts et Ladenson, 2004). Elle se caractérise le plus souvent par un déficit en T3 et T4 du à un dysfonctionnement de la glande thyroïde. L'étiologie principale de l'hypothyroïdie est le myxoedème primitif ou atrophie thyroïdienne idiopathique ; l'hypothyroïdie d'origine auto-immune touchant le plus souvent des femmes en période post-ménopausique (Steinmetz et al., 2002). Le diagnostic clinique repose sur le dosage de la TSH (très augmentée) complété éventuellement par celui de la thyroxine libre (FT4 diminuée) (Starr, 1959 ; Szabolcs et al., 1997). Des perturbations biologiques non spécifiques peuvent également être observées : dyslipidémie mixte, hypercholestérolémie, anémie (Gullberg et al., 2000 ; Duntas et al., 2002 ; Tienboon et Unachak, 2003). Par ailleurs, il existe des hypothyroïdies dites subcliniques qui se caractérisent par une FT4 sérique normale et une TSH légèrement augmentée. La prévalence de l'hypothyroïdie subclinique, fréquemment décrite chez les personnes âgées, est supérieure à celle de l'hypothyroïdie sévère (7,5% de la population générale) (Surks et al., 2004).

De nombreuses données de la littérature évoquent depuis plusieurs années les relations entre le statut thyroïdien et le statut vitaminique A, et ce tant au niveau de leur métabolisme au sens large, que de leur action cellulaire (voir chapitre III de l'introduction bibliographique). A titre d'exemple, une élévation de la concentration en rétinol plasmatique a été décrite en situation d'hypothyroïdie (Goswami et Choudhury, 1999). De plus, des rats rendus hypothyroïdiens présentent une diminution de l'expression des RAR dans le foie (Pallet et al., 1994 ; Coustaut et al., 1996). A l'inverse, une "down-régulation" de l'expression des récepteurs nucléaires de la T3 survient dans le foie des rats carencés en vitamine A (Higueret et al., 1989). Dans les études expérimentales que nous avons menées au cours de ce travail de thèse, nous avons également montré une baisse de l'expression des TR dans le cerveau de rats carencés en vitamine A (Husson et al., 2003). Enfin, s'il est parfaitement admis que le noyau

est le principal site où s'initie l'action des HT, nous savons que le récepteur de l'acide 9-*cis* rétinoïque, le RXR, est le partenaire commun d'hétéro-dimérisation des récepteurs de l'AR, RAR, et de la T3, TR (Kliwer et al., 1992). Nous voyons donc que chez l'animal, les modifications du statut thyroïdien ou du statut vitaminique A entraînent des altérations de leurs voies d'action au niveau nucléaire.

Pour poursuivre notre approche chez l'homme, il nous a semblé important, de vérifier d'une part (i) que des modifications avérées du statut hormonal (thyroïdien) se traduisaient, dans les PBMC, au niveau fonctionnel par des modifications de l'expression des récepteurs nucléaires de la T3, (ii) d'autre part, d'élucider si, chez l'homme comme chez l'animal, l'hypothyroïdie avait une incidence sur la voie d'action des rétinoïdes, enfin (iii) de comparer les résultats obtenus chez les patients hypothyroïdiens avec ceux obtenus chez les sujets âgés.

Ainsi, l'objectif de ce travail était d'étudier, chez l'homme, les conséquences de l'hypothyroïdie sur l'expression des récepteurs nucléaires de la T3 et de l'AR dans les PBMC.

Le recrutement de patients constitue une phase critique dans les programmes de recherche clinique. Pour cette étude, nous avons collaboré avec le Pr. A. Tabarin du service "d'Endocrinologie, diabétologie et maladies métaboliques" de l'hôpital Haut-Levêque (CHU Bordeaux). Dans cette étude, nous avons inclus des patients hospitalisés dans ce service, récemment thyroïdectomisés, nécessitant, pour les besoins du traitement, une interruption provisoire du traitement hormonal de substitution par la thyroxine et qui, de ce fait, étaient provisoirement hypothyroïdiens.

L'ensemble des résultats présentés dans cette étude fait l'objet de **l'article 4** soumis au *Journal of Molecular Endocrinology*.

## **II.1. METHODOLOGIE UTILISEE**

Les patients (au nombre de 22, âgés de 24 à 67 ans), recrutés par le Pr. A. Tabarin (CHU Bordeaux), avaient subi une thyroïdectomie pour adénome thyroïdien. Au moment de notre étude, le traitement supraphysiologique par l'hormone thyroïdienne T4 était interrompu pour préparer l'administration d'iode radioactif destinée à détruire les cellules thyroïdiennes rémanentes qui auraient échappées à l'ablation de la glande (Mizukami et al., 1990). Les patients recrutés présentaient alors un statut d'hypothyroïdie bien établi. Les 22 sujets "contrôles" de cette étude sont des volontaires de 24 à 57 ans en bon état de santé.

Dans un premier temps, les analyses cliniques de chacun des volontaires ont été réalisées dans le service d'Endocrinologie, diabétologie et maladies métaboliques de l'hôpital Haut-Levêque et au laboratoire de Biochimie de l'Hôpital Pellegrin (CHU Bordeaux). Par la suite, nous avons mesuré l'expression de diverses isoformes des récepteurs des HT ( $TR\alpha$  et  $TR\beta$ ) et des rétinoïdes ( $RAR\alpha$ ,  $RAR\gamma$ ,  $RXR\alpha$ ) dans les cellules mononucléées du sang des sujets recrutés.

## **II.2. PRINCIPAUX RESULTATS ET DISCUSSION PARTIELLE**

Dans un premier temps, nous avons caractérisé les statuts thyroïdien et vitaminiq ue A de la population recrutée. L'élévation importante des taux de TSH, accompagnée d'une disparition presque complète de T3 et T4 dans le plasma, a confirmé que, comme attendu, les patients recrutés souffraient d'une hypothyroïdie sévère (Roberts et Ladenson, 2004).

Les quantités d'ARNm codant pour les  $TR\beta$  sont significativement diminuées chez les patients hypothyroïdiens comparés aux sujets témoins alors que celles des  $TR\alpha$  ne sont pas modifiées. Sadow et al. (2003) ont récemment montré que les différents sous-types de récepteurs TR pouvaient répondre de manière opposée aux HT selon les tissus. De plus, chez les sujets témoins, une corrélation existe entre la concentration en T3 sérique et l'expression de  $TR\beta$  dans les PBMC. Cette association n'existe plus chez les sujets hypothyroïdiens chez lesquels la concentration en T3 n'a pas pu être estimée tant elle était faible (inférieure au seuil de détection de la méthode employée). Ces résultats vont dans le sens de l'autorégulation des  $TR\beta$  par la T3 chez l'homme (Lebel et al., 1993). Les données précédemment publiées à ce sujet divergent selon les auteurs. En effet, l'expression et la capacité de liaison des TR dans les cellules mononucléées du sang sont différemment modifiées chez des sujets

hypothyroïdiens (Kvetny et Wandrup, 1986 ; Nagayama et al., 1988 ; Meier-Heusler et al., 1995).

Par ailleurs, les patients hypothyroïdiens présentent une élévation significative de la concentration en rétinol plasmatique par rapport aux sujets contrôles. Ce résultat a déjà été rapporté par d'autres auteurs (Goswami et Choudhury, 1999). Malgré cela, une baisse significative du taux des ARNm des RAR $\alpha$  et RAR $\gamma$  est mise en évidence dans les PBMC de ces patients ; ce qui suggère que le dysfonctionnement thyroïdien induit une diminution de la biodisponibilité de l'AR au niveau cellulaire se traduisant par un hypofonctionnement de la voie d'action nucléaire de l'AR. Ces observations sont cohérentes avec les données obtenues chez l'animal rendu hypothyroïdien, et qui décrivent ce phénomène dans le foie et le cerveau. (Pallet et al., 1994 ; Coustaut et al., 1996 ; Enderlin et al., soumis).

Cette étude constitue la première évidence des conséquences de l'hypothyroïdie sur la fonctionnalité de l'AR, où l'on voit que contrairement à ce que laisserait supposer la concentration de rétinol sérique, le statut cellulaire des sujets hypothyroïdiens est à rapprocher de celui généré par une déficience en vitamine A.

Il serait d'un grand intérêt d'étudier maintenant les effets du traitement supraphysiologique par l'hormone thyroïdienne T4 sur l'action cellulaire des rétinoïdes.



**PUBLICATION 4**

**DECREASED EXPRESSION OF RETINOID NUCLEAR  
RECEPTORS (RAR $\alpha$  AND RAR $\gamma$ ) mRNA DETERMINED BY  
REAL-TIME QUANTITATIVE RT-PCR IN PERIPHERAL  
BLOOD MONONUCLEAR CELLS OF HYPOTHYROID  
PATIENTS**



**Decreased expression of retinoid nuclear receptors (RAR $\alpha$  and RAR $\gamma$ ) mRNA determined by real-time quantitative RT-PCR in peripheral blood mononuclear cells of hypothyroid patients**

**C Féart<sup>1</sup>, J Vallortigara<sup>1</sup>, D Higuere<sup>2</sup>, B Gatta<sup>3</sup>, A Tabarin<sup>3</sup>, V Enderlin<sup>1</sup>, P Higuere<sup>1</sup>  
and V Pallet<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> *Unité de Nutrition et Signalisation Cellulaire (E.A. MENRT, Usc INRA) ISTAB  
Avenue des Facultés Université Bordeaux 1, 33405 Talence*

<sup>2</sup> *Service de Biochimie de l'Hôpital Pellegrin, Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux, Place Amélie Raba  
Léon, 33000 Bordeaux*

<sup>3</sup> *Service d'Endocrinologie, Diabétologie et Maladies Métaboliques de l'Hôpital Haut-Levêque, Centre  
Hospitalier Universitaire de Bordeaux, Avenue Magellan, 33600 Pessac*

This research was supported by a grant from the Conseil Régional d'Aquitaine.

**Abstract**

In vivo assessment of the cellular impact of thyroid hormones on target tissues might be of help for physiological studies and to evaluate the consequences of various diseases of the thyroid gland in humans. Given the tenuous relationship between retinoid and triiodothyronine status and that retinoids also have intracellular roles, the aim of this study was to determine the effect of hypothyroidism on the expression of triiodothyronine (TR) and retinoic acid (RAR, RXR) nuclear receptors in human peripheral blood mononuclear cells (PBMC). Using real time RT-PCR, the relative amount of mRNA of the thyroid (TR $\alpha$  and TR $\beta$ ) and retinoid (RAR $\alpha$ , RAR $\gamma$ , and RXR $\alpha$ ) nuclear receptors in PBMC of euthyroid (n=22) compared to hypothyroid (n=22) subjects was quantified. Classical plasma parameters [free T3 (FT3), T4 (FT4), thyroid stimulating hormone (TSH), retinol (ROH), retinol binding protein (RBP), and transthyretin (TTR)] were also measured. In hypothyroid subjects, the concentration of TSH was elevated and dramatically low T3 and T4 concentrations were associated with a decrease in the expression of TR $\beta$ . Expression of RAR $\alpha$  and RAR $\gamma$  significantly decreased in hypothyroid *versus* control subjects while an increased concentration of retinol was emphasized by hypothyroidism. These results first indicated that primary hypothyroidism induced hypoactivation of the retinoid nuclear pathway in PBMC which was not predicted by the plasma retinol level. Further investigations will be necessary to evaluate these parameters in very small changes in thyroid hormone production such as mild (subclinical) hypothyroidism.

## **1. Introduction**

The physiological actions of thyroid hormones in the regulation of diverse cellular activities, including normal growth and general metabolism, are well defined (review in Yen 2001). Thyroid disorders such as hyper- and hypothyroidism induce considerable consequences in children and adults. For example, children born with congenital hypothyroidism who lack of thyroid hormones during a circumscribed period of early development are at risk of brain damage and mental retardation (review in Rovet and Daneman 2003). Assessment of thyroid function in humans is commonly performed using plasma free T4 and TSH measurements. Low serum FT4 contrasting with elevated TSH concentrations confirms the diagnosis of hypothyroidism and signifies that it is due to failure of the thyroid gland (primary hypothyroidism). Thus, in human studies, only plasma parameters are used to characterise the thyroid hormone status of an individual even though thyroid hormones have a mainly intracellular role. Indeed, there is strong evidence pointing to the nucleus as the principal site for the initiation of thyroid hormone action (Oppenheimer 1999). Assessment of the cellular impact of thyroid hormone deficiency might be of help in circumstances such as thyroid hormone resistance. Elsewhere, many older patient have abnormal TSH levels without other alterations in serum thyroid hormone levels, conditions defined as sub-clinical hypothyroidism, which occurs in 4.5% to 8% of elderly subjects (Surks *et al.* 2004). The clinical consequences of such condition are controversial and there is therefore the need for the development of alternative markers of the cellular impact of thyroid hormones. Within the cell, these actions are mediated by specific triiodothyronine nuclear receptors (TR $\alpha$  and TR $\beta$ ), which regulate the expression of targeted genes (review in Yen 2001; Viguierie and Langin 2003). These receptors belong to the superfamily of hormone nuclear receptors which function as ligand activated transcription factors (Aranda and Pascual 2001).

Like TR, retinoid nuclear receptors (RAR $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  and RXR $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) are also members of the hormone receptor superfamily and regulate target genes in response to RA ligand (retinoic acid, the active form of vitamin A) (Marill *et al.* 2003). Vitamin A, via RA, exerts a wide variety of profound effects on growth, tissue differentiation and homeostasis (Sporn *et al.* 1994; review in Bastien and Rochette-Egly 2004). It has been shown that RXR forms heterodimers with either RAR or TR in order to regulate gene transcription by interacting with distinct sequences in the promoter of target genes. The fact that RXR is the essential common partner for the functional heterodimer indicates that thyroid hormones and retinoid

signalling pathways are in close relationship (Schröder and Carlberg 1994; Mangelsdorf and Evans 1995, Li *et al.* 2002). We have shown that a decrease in maximal binding capacity of TR and RAR in the liver as well as decreased affinity for their ligand have been observed in hypothyroid rats compared to controls (Pallet *et al.* 1994). Inversely, vitamin A status may influence thyroid hormone signalling. Indeed, decreased expression of TR has been observed in the liver and the brain of rats fed a vitamin A deficient diet (Higueret *et al.* 1989; Husson *et al.* 2003). Likewise, many interactions between thyroid hormones and retinoid nuclear signalling have been reported, at the plasmatic level, in studies performed in humans or animals. Hypothyroidism is associated to elevated retinol (ROH) and  $\beta$ -carotene concentrations in humans (Goswami and Choudhury 1999). Mice lacking the transthyretin gene (TTR, a protein that binds and carries thyroxin) exhibit decreased ROH and retinol binding protein (RBP) concentrations (van Bennekum *et al.* 2001). Moreover, Coxa *et al.* (1997) have reported that TSH secretion in rats is partly regulated *in vivo* by RA.

Expression of TR $\alpha$  and TR $\beta$  in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) is sensitive to thyroid status (Meier-Heusler *et al.* 1995). Some RA nuclear receptors, RAR $\alpha$ , RAR $\gamma$ , RXR $\alpha$  and RXR $\beta$ , have also been found in these cells (Szabova *et al.* 2003). Given that retinoids and thyroid hormones have mainly intracellular action, the aim of the present study was, two-fold: firstly, to establish the consequences of primary hypothyroidism on the expression of TR $\alpha$  and TR $\beta$  in human PBMC, and secondly, to clarify the consequences on the expression of retinoid nuclear receptors, RAR $\alpha$ , RAR $\gamma$  and RXR $\alpha$  in PBMC. The amount of mRNA of TR $\alpha$ , TR $\beta$ , RAR $\alpha$ , RAR $\gamma$  and RXR $\alpha$  was quantified using a real time RT-PCR method.

The classical thyroid parameters of euthyroid and hypothyroid subjects were also measured (FT3, FT4 and TSH), as well as those classically used to qualify the vitamin A status (retinol and RBP concentrations and the RBP:TTR ratio assessment).

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Subjects**

Forty-four men and women volunteers are recruited for this study: 22 (24-57 year-old) in the euthyroid group and 22 (24-67 year-old) in the hypothyroid group. Subjects of the euthyroid group were selected among volunteers, according to their health (and thyroid status). Hypothyroid patients were recruited in the Endocrinology, Diabetology, and Metabolic Disease Unit of l'Hôpital Haut-Levêque, a university teaching hospital in Bordeaux, France. All patients underwent total thyroidectomy for papillary carcinoma and were referred for complementary <sup>131</sup>I therapy. For this purpose, thyroid hormone replacement therapy was withdrawn for 4 weeks. Blood samples were collected immediately prior to radioactive iodine therapy. All patients gave informed consent.

### **2.2. Health status**

Venous blood was collected from all subjects after overnight fasting (≈12 h after previous meal). Diagnostics kits (RIA and IRMA, Immunotech, Marseille, France) were used to measure plasma free triiodothyronine (FT3), free thyroxin (FT4) and thyroid stimulating hormone (TSH) concentration. The plasma retinol (ROH) concentration was determined by high-pressure liquid chromatography (HPLC) according to the method of Leclercq and Bourgeay-Cause (1981). Plasma transthyretin (TTR) and retinol binding protein (RBP) concentrations were measured using an immuno-nephelometric process (Nephelometer Analyser II; Behring Diagnostics Inc., USA). Total plasma cholesterol (TC) and total triglyceride (TTG) concentrations were measured by an enzymatic method using a Synchron CX5 analyser (Beckman Coulter, USA). It has not been always possible to measure the plasma parameters for all the subjects.

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

Isolation of human blood mononuclear cells was performed by density gradient centrifugation using Ficoll-Paque Plus solution (Amersham Biosciences, F-91898 Orsay Cedex, France). After overnight fasting, venous blood (5 ml) was drawn into an EDTA-coated vacutainer tube and layered onto 4 ml of Ficoll-Paque Plus solution and then centrifuged at 400 g for 20 min at 20°C. PBMC were removed from the plasma-Ficoll interface, washed twice in a phosphate buffered solution (PBS 1M, pH 7.2) to remove platelets, Ficoll-Paque and plasma. PBMC were then suspended in TRIzol Reagent (Invitrogen, Cergy-Pontoise,

France) for total RNA preparation. PBMC from euthyroid and hypothyroid subjects were assayed simultaneously in all assays to ensure that differences between groups were indeed biological and not a result of inter-assay variation.

## **2.4. Quantification of mRNA expression**

### 2.4.1. Total RNA preparation

Blood mononuclear cells were directly homogenized in 1 mL of TRIzol reagent solution and total RNA was extracted following the manufacturer's suggested protocol for small quantities of tissue. Purified RNA was quantified and assessed for purity by UV spectrophotometry. Average yield of total RNA extraction was not significantly different in PBMC from euthyroid and hypothyroid subjects.

### 2.4.2. Reverse transcription and analysis of gene expression

Reverse transcription and analysis of gene expression using a real time Polymerase Chain Reaction (PCR assay involving a Light Cycler<sup>TM</sup> technology) was carried out as described by Redonnet *et al.* (2002) with minor modifications specific to the gene studied. The forward and reverse primer sequences are shown in Table 1. Specificity of primers was validated through the verification of RT-PCR product specificity. The identity of amplified products was verified by sequencing with the Dye Terminator Reaction Cycle Kit (Perkin-Elmer, Norwalk, CT) and analysed on an ABI PRISM<sup>TM</sup> 377 automated DNA sequencer (Perkin-Elmer).

Cyclophilin and porphobilinogen deaminase (PBGD) cDNA were used as housekeeping for the relative quantification of cDNA of RAR $\alpha$ , RXR $\alpha$ , TR $\alpha$  and RAR $\gamma$ , TR $\beta$ , respectively. 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 level of the housekeeping genes was unaffected by hypothyroidism. It has not been always possible to quantify the relative amount of each nuclear receptor for all the subjects.

## **2.5. Statistical analysis**

Data are expressed as means  $\pm$  SEM. All statistics were performed using Statgraphics Plus software. The statistical significance of differences between means was calculated by Kruskal-Wallis test because the SD appeared to be different between the two groups. Linear

regression was used to analyse the relationships between variables. Statistical significance was accepted at  $P < 0.05$ .

**Table 1** : Primers used for LightCycler™ real-time PCR

PCR primer pair	Ref.	Sequence		Position	Product Length (bp)
		Sequences are shown for forward (F) and reverse (R) primers as well as size of amplicon			
<b>PBGD</b>	Raich <i>et al.</i> 1986	F : 5'-TGCACGATCCCGAGACTCTGC-3'		743-763	90
		R : 5'-GCACGGCTACTGGCACACTGC-3'		812-832	
<b>Cyclophilin</b>	Haendler <i>et al.</i> 1987	F : 5'- TCCTAAAGCATAACGGGTCCTGGCAT-3'		280-304	165
		R : 5'- CGCTCCATGGCCTCCACAATATTCA-3'		421-445	
<b>RAR<math>\alpha</math></b>	Giguere <i>et al.</i> 1987	F : 5'-CTGCCAGTACTGCCGACTGC-3'		519-538	235
		R : 5'-ACGTTGTTCTGAGCTGTTGTTTCGTA-3'		729-753	
<b>RAR<math>\gamma</math></b>	Krust <i>et al.</i> 1989	F : 5'-CTGCCAGTACTGCCGGCTAC-3'		837-856	228
		R : 5'-TCTGCACTGGAGTTCGTGGTATACT-3'		1040-1064	
<b>RXR<math>\alpha</math></b>	Mangelsdorf <i>et al.</i> 1990	F : 5'-CGACCCTGTCACCAACATTTGC-3'		861-882	142
		R : 5'-GAGCAGCTCATTCCAGCCTGCC-3'		981-1002	
<b>TR<math>\alpha</math></b>	Laudet <i>et al.</i> 1991	F : 5'-GTTCTAGATGACTCGAAGGCGGG-3'		838-860	119
		R : 5'-CTTCAGGAGTGGGCTCTGGTCG-3'		935-956	
<b>TR<math>\beta</math></b>	Weinberger <i>et al.</i> 1986	F : 5'-CCGAAGCACTGTCCAGACCGAGAAC-3'		334-358	90
		R : 5'-TCAAAGACTTCCAAGAAGAGAGGC-3'		399-423	



### **3. Results**

#### **3.1. Thyroid status and mRNA expression of triiodothyronine receptors TR $\alpha$ and TR $\beta$ in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from euthyroid and hypothyroid subjects.**

*The results are summarized in table 2 and 3.*

The plasma free thyroid hormone concentrations (FT3 and FT4) and the TSH concentration are used clinically to diagnose thyroid disorders. In the hypothyroid group, FT3 and FT4 concentrations were undetectable, while the TSH concentration was dramatically increased compared to the euthyroid group.

The mRNA expression of the thyroid nuclear receptors was assessed in PBMC of healthy euthyroid *versus* hypothyroid subjects. The amount of TR $\beta$  mRNA was significantly reduced in the hypothyroid compared to the euthyroid group (-25%). On the other hand, the amount of TR $\alpha$  mRNA remained unchanged.

#### **3.2. Vitamin A status and mRNA expression of retinoid receptors RAR $\alpha$ , RAR $\gamma$ and RXR $\alpha$ in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from euthyroid and hypothyroid subjects**

*The results are summarized in table 2 and 3.*

The vitamin A status of all subjects was determined by measuring retinol (ROH) and retinol binding protein (RBP) concentrations. RBP was proposed as a simple surrogate for vitamin A assessment. Hypothyroid subjects exhibited a significant increase in concentration of ROH (+26%) and no change in RBP concentration. As a consequence, the ratio ROH:RBP also increased in the hypothyroid compared to the euthyroid group (+24%). The molar ratio of retinol-binding-protein to transthyretin (RBP:TTR), used as an indirect method of vitamin A assessment, was unchanged in the hypothyroid group compared to the control. The transthyretin (TTR), which is both, a protein that binds and carries thyroxin (T4) and a marker of malnutrition, was unaffected by hypothyroidism. Several subtypes of retinoid receptors were expressed in human PBMC. The relative abundance of RAR $\alpha$  and RAR $\gamma$  mRNA was significantly reduced in PBMC of hypothyroid compared to euthyroid subjects (-18% and –

25%, respectively), whereas the amount of mRNA encoding the RXR $\alpha$  receptor isoform was not modified by hypothyroidism in the PBMC.

### 3.3. Lipid parameters

The total cholesterol and fasting triglyceride concentrations increased in hypothyroid compared to euthyroid subjects (+64% and +132% respectively) (Table 2).

**Table 2** : Plasma concentration of thyroid hormones, vitamin A and transport proteins in the euthyroid and hypothyroid groups

	Laboratory reference range	Euthyroid Group (total n=22)		Hypothyroid Group (total n=22)	
		mean $\pm$ s.e.m. (n)	range	mean $\pm$ s.e.m. (n)	range
<b>FT3</b> (pmol/L)	2.5-5	3.65 $\pm$ 0.09 (22)	2.9-4.3	ud	-
<b>FT4</b> (pmol/L)	10-20	14.07 $\pm$ 0.26 (22)	11.7-16.4	ud	-
<b>TSH</b> ( $\mu$ UI/ml)	0.3-3.5	1.77 $\pm$ 0.15 (20)	0.9-3.8	112.3 $\pm$ 15.3* (22)	10-288
<b>Retinol</b> ( $\mu$ mol/L)	1.5-3	2.09 $\pm$ 0.08 (20)	1.5-2.6	2.63 $\pm$ 0.16* (22)	1.4-4.0
<b>RBP</b> ( $\mu$ mol/L)	1.7-2.9	2.03 $\pm$ 0.09 (19)	1.4-2.7	2.01 $\pm$ 0.12 (22)	1.0-3.2
<b>ROH:RBP</b> (mol/mol)	0.9-1.3	1.06 $\pm$ 0.01 (19)	0.9-1.2	1.31 $\pm$ 0.01* (22)	1.2-1.4
<b>RBP:TTR</b> (mol/mol)	-	0.38 $\pm$ 0.01 (19)	0.3-0.5	0.35 $\pm$ 0.01 (22)	0.2-0.5
<b>TTR</b> ( $\mu$ mol/L)	3.6-7.3	5.42 $\pm$ 0.18 (19)	4.0-6.9	5.64 $\pm$ 0.18 (22)	3.1-8.5
<b>Total Cholesterol</b> (mmol/L)	4-6.2	4.96 $\pm$ 0.19 (21)	3.8-7.2	8.12 $\pm$ 0.39* (22)	5.0-11.8
<b>Total Triglyceride</b> (mmol/L)	0.3-1.8	0.77 $\pm$ 0.07 (21)	0.3-1.3	1.79 $\pm$ 0.18* (22)	0.7-3.8

Statistical analyses were performed using Kruskal-Wallis test.

\*Significantly different from euthyroid group,  $P < 0.05$ . ud : undetectable

**Table 3** : Effect of hypothyroidism on the relative expression of T3 and RA nuclear receptors in human PBMC

	Euthyroid Group (total n=22)		Hypothyroid Group (total n=22)	
	mean $\pm$ s.e.m (n)	range	mean $\pm$ s.e.m. (n)	range
<b>RAR<math>\alpha</math></b> (%Cyclophilin)	35.9 $\pm$ 2.1 (15)	22-46	29.4 $\pm$ 1.1* (22)	20-41
<b>RAR<math>\gamma</math></b> (%PBGD)	193.1 $\pm$ 12.7 (16)	111-283	145.5 $\pm$ 5.2 * (20)	105-187
<b>RXR<math>\alpha</math></b> (%Cyclophilin)	25.2 $\pm$ 1.1 (12)	20-30	23.8 $\pm$ 1.5 (20)	13-33
<b>TR<math>\alpha</math></b> (%Cyclophilin)	4.9 $\pm$ 0.2 (19)	3.5-6.8	5.2 $\pm$ 0.3 (20)	3.0-10.4
<b>TR<math>\beta</math></b> (%PBGD)	12.6 $\pm$ 0.6 (14)	9.1-16.2	9.4 $\pm$ 1.0 * (19)	3.0-21.2

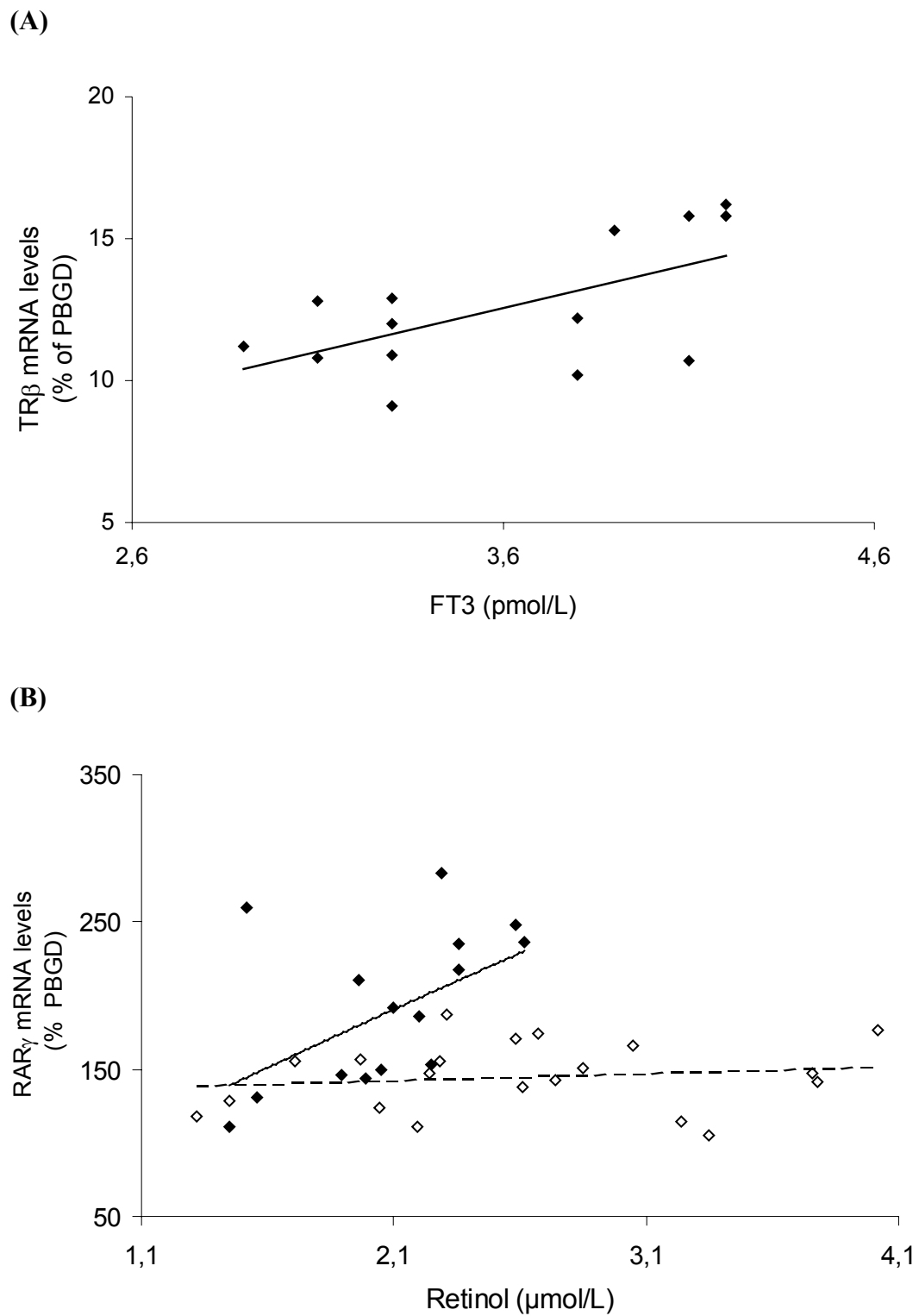
Statistical analyses were performed using Kruskal-Wallis test.

\*Significantly different from euthyroid group,  $P < 0.05$ .

### 3.4. Correlations between plasma parameters and the relative expression of nuclear receptors

*The results are summarized in Figure 1.*

Correlations were demonstrated between plasma parameters and nuclear receptor mRNA expression. In euthyroid subjects, PBMC TR $\beta$  expression was related to FT3 concentration ( $r=0.60$ ,  $P=0.022$ ). Likewise, a significant positive correlation between the ROH concentration and the mRNA expression of RAR $\gamma$  was found in the euthyroid group ( $r=0.52$ ,  $P=0.045$ ) but disappeared in hypothyroid patients ( $r=0.15$ ,  $P=0.53$ ).



**Figure 1**

Correlations between **(A)** TR $\beta$  mRNA levels in PBMC and FT3 concentrations in the euthyroid group ( $\blacklozenge$   $n = 14$ ;  $r = 0.60$ ,  $P = 0.022$ ) and **(B)** RAR $\gamma$  mRNA levels in PBMC and retinol concentration in the euthyroid ( $\blacklozenge$   $n = 15$ ;  $r = 0.52$ ,  $P = 0.045$ ) and hypothyroid groups ( $\diamond$   $n = 20$ ;  $r = 0.15$ ,  $P = 0.53$ )

#### **4. Discussion**

Hypothyroidism, a common thyroid disorder, affects every major organ system and metabolic process (Heitman and Irizarry 1995). The clinical manifestations of overt hypothyroidism and the consequences of this dysfunction on further biological markers, such as lipid status markers, are well defined at the circulation level in humans. In the present study, total cholesterol and triglycerides, was assessed in euthyroid and hypothyroid groups. A classical hypothyroid-related increase in total cholesterol and triglyceride concentrations was described, which could be directly attributed to the collapse of the thyroid status because the regulation of the lipid metabolism is T3-dependent (Gullberg *et al.* 2000; Macchia *et al.* 2001). Indeed, Efstathiadiou *et al.* (2001) and Duntas *et al.* (2002) have reported that the composition and transport of lipoproteins are slightly or seriously disturbed in thyroid diseases.

Patients recruited for this study were thyroidectomized thyroid carcinoma prior to the study and thyroid hormone replacement therapy was withdrawn for 4 weeks in order to achieve complementary 131-iodine therapy. As expected, patients exhibited a massive rise in TSH concentration with an almost complete disappearance of T3 and T4 from the plasma. These results are consistent with profound although recent hypothyroidism

The amounts of TR $\alpha$  and TR $\beta$  mRNA were quantified in order to determine the nuclear function of thyroid hormones in the PBMC. Hypothyroidism led to a significant decreased expression of TR $\beta$  mRNA in PBMC, contrary to TR $\alpha$  mRNA expression, which was not significantly changed.

Hormonal regulation of TR in human lymphocytes has been demonstrated but the present results differ from previous observations. Indeed, TR $\alpha$  mRNA has been found up regulated by hypothyroidism in lymphocytes (Nagayama *et al.* 1988). Similarly, Li *et al.* (1990) have described an increase in the maximal binding capacity of TR in hypothyroid conditions. Meier-Heusler *et al.* (1995), developing an assay for the quantitative determination of TR $\beta_1$  mRNA levels in human tissue samples, have found no change in TR $\beta$  expression in blood cells from hypothyroid subjects. The present result differed from this last observation, because only a slight but not significant increased of TR $\alpha$  mRNA expression was observed. The divergence between the present results and those of the studies previously mentioned, concerning the TR $\alpha$  and TR $\beta$  expression, may be due to the sensitivity and of the methods used. Northern blot analysis, dot blot hybridisation and quantitative competitive PCR

techniques previously applied were, indeed, less specific and sensitive than the real-time RT-PCR performed in this study.

In the euthyroid group, the level of expression of TR $\beta$  appeared to be well correlated to the FT3 concentration ( $r=0.60$ ,  $P=0.022$ ). In the hypothyroid group, such associations were lost in that T3 disappeared from the circulation.

The effects of hypothyroidism on retinoid nuclear receptors are poorly defined in humans. The circulating levels of the major dietary retinoid detectable in blood, retinol (ROH) and its carrier in blood the Retinol Binding Protein (RBP) were determined (Almekinder *et al.* 2000; De Pee and Dary 2002). This study established that an increase in plasma retinol level is associated with hypothyroidism. A comparable result has already been obtained in hypothyroid women, who also exhibited an increase in  $\beta$ -carotene in plasma (Goswami and Choudhury 1999). The RBP concentration appeared not to be affected by hypothyroidism, indeed, it remained within the laboratory reference range in hypothyroid patients. Consequently, the ROH:RBP ratio, which is normally around 1 (revealing the 1:1 molar complex between ROH and RBP) increased with hypothyroidism. Moreover, it is interesting to note that no subject had a fasting plasma retinol concentration under 1.4  $\mu\text{mol/l}$ , a threshold assumed to indicate a risk of vitamin A deficiency (Herberg *et al.* 1994).

TTR plasma concentration is also a sensitive indicator of malnutrition and illness (Robbins *et al.* 2002). In the present case, hypothyroidism appeared without consequence on its concentration in plasma. This, which has been previously observed by Marrocco *et al.* (1984), was a further indicator allowed us to say that the population was not affected by malnutrition particularly by a lack of iodine. Indeed, a reduction of TTR production rate in combination with its very rapid rate of disappearance from the circulation has been described as occurring with malnutrition (Ingenbleek *et al.* 1975). Moreover, Centanni *et al.* (1995 and 1998) found that the RBP and the TTR concentrations decreased in children and adults exposed to mild or overt hypothyroidism due to iodine deficiency. The discrepancy between their results and ours could indeed be explained by the fact that, in the present study, recruited subjects were hypothyroid because of thyroidectomy and not because of deficient iodine intake. The short duration of hypothyroidism in our patient might also play a role. Using the calculation of the RBP:TTR molar ratio, presented as an indirect method to evaluate vitamin A status (Zago *et al.* 2002; Rosales *et al.* 2002), and which must be above 0.37, euthyroid subjects exhibited a good vitamin A status, whereas hypothyroid subjects showed a mean

ratio under 0.37 which seemed indicate a slight risk of vitamin A deficiency (vitamin A deficiency being defined as a cut-off point below 0.37).

The main purpose of the present study was to investigate whether retinoid nuclear signalling, i.e. the retinoid nuclear receptors, was modified by hypothyroidism in PBMC, knowing the close relationship, often described in the literature, between thyroid hormones and retinoid signalling. Indeed, in hypothyroid animals, a down-regulation of the retinoid nuclear receptors occurs in the liver (Coustaut *et al.* 1996) and the brain (Enderlin *et al.* unpublished data). Thus the expression of RAR $\alpha$ , RAR $\gamma$  and RXR $\alpha$  at the mRNA level in the PBMC of euthyroid compared to hypothyroid subjects was quantified. No RXR $\beta$  mRNA was detected in the PBMC of either group. Previous published data are controversial with similar findings to ours (our data were coherent with the observation of Lomo *et al.* (1998) while Szabova *et al.* (2003) showed the contrary, i.e. the expression of RXR $\beta$  mRNA in human PBMC). Hypothyroidism did not induce any modifications of RXR $\alpha$  expression. The expression of RAR $\alpha$  and RAR $\gamma$  mRNA were significantly reduced in hypothyroid relative to control subjects (-18% and -25%, respectively), even when an increase in the ROH concentration level was observed in this situation. The reduction in the retinoid nuclear receptors must be drawn nearer to (i) the elevation of the plasma ROH concentration and (ii) the RBP:TTR ratio which seemed to indicate a slight vitamin A deficiency in hypothyroidism. Together these data showed that hypothyroidism induces a deregulation of the vitamin A metabolism, leading to hypo-function of retinoid nuclear signalling, which is detectable in the PBMC. Moreover, the RBP:TTR molar ratio was a good indicator of this phenomenon, better than the ROH plasma concentration. Other data have confirmed this observation, indeed, a good correlation between ROH concentration and the RAR $\gamma$  mRNA amount, demonstrated in euthyroid, disappeared in hypothyroid subjects.

In conclusion, hypothyroidism induced changes in plasma thyroid hormones, TSH concentrations but also a decreased expression of TR $\beta$  in PBMC. Interestingly, it seems that thyroidectomy-induced hypothyroidism also generates modifications in the cellular bio-availability of retinoic acid, the manifestation of which is, at the nuclear level, the down-regulation of some retinoic acid receptors in human PBMC. In this perspective it might be speculated that hypoactivation of the retinoid signalling occurs in other tissues of the hypothyroid individual, similarly to our findings obtained in the liver of hypothyroid rats. (Pallet *et al.* 1994; Coustaut *et al.* 1996).

Elsewhere, measurement of retinoid and thyroid receptors expression might be a useful tool for the cellular assessment of the impact of thyroid hormones. Further studies conducted in so-called subclinical situations such as hypothyroidism will be useful to determine the true impact of subtle hormone deficiency at the cellular level and the usefulness of these peripheral cellular markers to characterize the hormonal status when classical thyroid hormone measurement display only minor changes.

## **5. References**

- Almekinder J, Manda W, Soko D, Lan Y, Hoover DR & Semba RD. 2000. Evaluation of plasma retinol-binding protein as a surrogate measure for plasma retinol concentrations. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. **60** 199-203.
- Aranda A & Pascual A. 2001. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiological Review*. **81** 1269-304.
- Bastien J & Rochette-Egly C. 2004. Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. *Gene*. **328** 1-16.
- Centanni M, Maiani G, Parkes AB, N'Diaye AM, Ferro-Luzzi A & Lazarus JH. 1995. Thyroid homeostasis and retinol circulating complex relationships in a severe iodine-deficient area of Senegal. *Journal of Endocrinological Investigation*. **18** 608-12.
- Centanni M, Maiani G, Vermiglio F, Canettieri G, Sanna AL, Moretti F, Trimarchi F & Andreoli M. 1998. Combined impairment of nutritional parameters and thyroid homeostasis in mildly iodine-deficient children. *Thyroid*. **8** 155-59.
- Coustaut M, Pallet V, Garcin H & Higuere P. 1996. The influence of dietary vitamin A on triiodothyronine, retinoic acid, and glucocorticoid receptors in liver of hypothyroid rats. *British Journal of Nutrition*. **76** 295-306.
- Coya R, Carro E, Mallo F & Dieguez C. 1997. Retinoic acid inhibits in vivo thyroid-stimulating hormone secretion. *Life Sciences*. **60** 247-50.
- de Pee S & Dary O. 2002. Biochemical indicators of vitamin A deficiency: serum retinol and serum retinal binding protein. *Journal of Nutrition*. **132** 2895S-2901S.
- Duntas LH. 2002. Thyroid disease and lipids. *Thyroid* **12** 287-93.
- Efstathiadou Z, Bitsis S, Milionis HJ, Kukuvitis A, Bairaktari ET, Elisaf MS & Tsatsoulis A. 2001. Lipid profile in subclinical hypothyroidism: is L-thyroxine substitution beneficial? *European Journal of Endocrinology*. **145** 705-10.
- Enderlin V, Vallortigara J, Alfos S, Féart C, Pallet V & Higuere P. Retinoic acid reverses the PTU-related decrease of its own receptors and neurogranin level in mice brain. Submitted.
- Giguere V, Ong ES, Segui P & Evans RM. 1987. Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid. *Nature* **330** 624-629.



- Goswami UC & Choudhury S. 1999. The status of retinoids in women suffering from hyper- and hypothyroidism: interrelationship between vitamin A, beta-carotene and thyroid hormones. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*. **69** 132-35.
- Gullberg H, Rudling M, Forrest D, Angelin B & Vennstrom B. 2000. Thyroid hormone receptor beta-deficient mice show complete loss of the normal cholesterol 7alpha-hydroxylase (CYP7A) response to thyroid hormone but display enhanced resistance to dietary cholesterol. *Molecular Endocrinology*. **14** 1739-49.
- Haendler B, Hofer-Warbinek R & Hofer E. 1987. Complementary DNA for human T-cell cyclophilin. *EMBO Journal*. **6** 947-50.
- Heitman B & Irizarry A. 1995. Hypothyroidism: common complaints, perplexing diagnosis. *The Nurse Practitioner*. **20** 54-60.
- Hercberg S, Preziosi P, Galan P, Devanlay M, Keller H, Bourgeois C, Potier de Courcy G & Cherouvrier F. 1994. Vitamin status of a healthy French population: dietary intakes and biochemical markers. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*. **64** 220-32.
- Higueret P, Paillet I & Garcin H. 1989. Vitamin A deficiency and tri-iodothyronine action at the cellular level in the rat. *Journal of Endocrinology*. **121** 75-79.
- Husson M, Enderlin V, Alfos S, Féart C, Higueret 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. *British Journal of Nutrition* **90** 191-98.
- Ingenbleek Y, Van Den Schrieck HG, De Nayer P & De Visscher M. 1975. Albumin, transferrin and the thyroxine-binding prealbumin/retinol-binding protein (TBPA-RBP) complex in assessment of malnutrition. *Clinica Chimica Acta*. **63** 61-7.
- Krust A, Kastner P, Petkovich M, Zelent A & Chambon P. 1989. A third human retinoic acid receptor, hRAR-gamma. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the U S A*. **86** 5310-5314.
- 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 Research*. **19** 1105-1112.
- Leclercq M & Bourgeay-Causse M. 1981. A simple, reliable fast method: simultaneous proportioning of retinol and serum tocopherol by high performance liquid chromatography. *Revue Institut Pasteur Lyon*. **14** 475-496.
- Li D, Li T, Wang F, Tian H & Samuels HH. 2002. Functional evidence for retinoid X receptor (RXR) as a nonsilent partner in the thyroid hormone receptor/RXR heterodimer. *Molecular and Cellular Biology*. **22** 5782-92.
- 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. *Chinese Medical Journal (England)*. **103** 355-8.
- Lomo J, Smeland EB, Ulven S, Natarajan V, Blomhoff R, Gandhi U, Dawson MI & Blomhoff HK. 1998. RAR-, not RXR, ligands inhibit cell activation and prevent apoptosis in B-lymphocytes. *Journal of Cellular Physiology*. **175** 68-77.
- Macchia PE, Takeuchi Y, Kawai T, Cua K, Gauthier K, Chassande O, Seo H, Hayashi Y, Samarut J, Murata Y, Weiss RE & Refetoff S. 2001. Increased sensitivity to thyroid

- hormone in mice with complete deficiency of thyroid hormone receptor alpha. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the U S A.* **98** 349-54.
- Mangelsdorf DJ, Ong ES, Dyck JA & Evans RM. 1990. Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway. *Nature.* **345** 224-29.
- Mangelsdorf DJ & Evans RM. 1995. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell.* **83** 841-50.
- Marill J, Idres N, Capron CC, Nguyen E & Chabot GG. 2003. Retinoic acid metabolism and mechanism of action: a review. *Current Drug Metabolism.* **4** 1-10.
- Marrocco W, Adonccchi L, Suraci C, Pecora P, Porra R, Gallinella B & Cavina G. 1984. Behavior of vitamin A, beta-carotene, retinol binding protein and prealbumine in the plasma of hypo- and hyperthyroid subjects. *Bolletino della Societa Italiana di Biologia Sperimentale.* **60** 769-75.
- 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. *Journal of Endocrinological Investigation.* **18** 767-73.
- Nagayama Y, Yamashita S, Hirayu H, Ashizawa K, Harakawa S, Inoue S, Izumi M & Nagataki S. 1988. Expression and regulation of c-erb-A mRNA from lymphocytes in patients with thyroid dysfunction. *Endocrinologia Japonica.* **35** 463-7.
- Oppenheimer JH. 1999. Evolving concepts of thyroid hormone action. *Biochimie.* **81** 539-43.
- Pallet V, Audouin-Chevallier I, Verret C, Garcin H & Higuieret P. 1994. Retinoic acid differentially modulates triiodothyronine and retinoic acid receptors in rat liver according to thyroid status. *European Journal of Endocrinology.* **131** 377-84.
- 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 Research.* **14** 955-68.
- 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. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Ddisorders .* **26** 20-7.
- Robbins J. 2002. Transthyretin from discovery to now. *Clinical Chemistry and Laboratory Medecine.* **40** 183-90.
- Rosales FJ, Chau KK, Haskell MH & Shankar AH. 2002. Determination of a cut-off value for the molar ratio of retinol-binding protein to transthyretin (RBP:TTR) in Bangladeshi patients with low hepatic vitamin A stores. *Journal of Nutrition.* **132** 3687-92.
- Rovet J & Daneman D. 2003. Congenital hypothyroidism: a review of current diagnostic and treatment practices in relation to neuropsychologic outcome. *Paediatric Drugs.* **5** 141-9.
- Schrader M & Carlberg C. 1994. Thyroid hormone and retinoic acid receptors form heterodimers with retinoid X receptors on direct repeats, palindromes, and inverted palindromes. *DNA and Cell Biology.* **13** 333-41.
- Sporn MB, Roberts,AB & Goodman D. 1994. The Retinoids: Biology, Chemistry, and Medicine. In Press, R.ed. New York.

- Stockigt JR. 2002. Case finding and screening strategies for thyroid dysfunction. *Clinica Chimica Acta*. **315** 111-24.
- Surks MI, Ortiz E, Daniels GH, Sawin CT, Col NF, Cobin RH, Franklyn JA, Hershman JM, Burman KD, Denke MA, Gorman C, Cooper RS & Weissman NJ. 2004. Subclinical thyroid disease: scientific review and guidelines for diagnosis and management. *Journal of the American Medical Association*. **291** 228-38.
- 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 Sciences*. **72** 831-6.
- van Bennekum AM, Wei S, Gamble MV, Vogel S, Piantedosi R, Gottesman M, Episkopou V & Blaner WS. 2001. Biochemical basis for depressed serum retinol levels in transthyretin-deficient mice. *Journal of Biological Chemistry*. **276** 1107-13.
- Viguerie N & Langin D. 2003. Effect of thyroid hormone on gene expression. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolism Care*. **6** 377-81.
- Weinberger C, Thompson CC, Ong ES, Lebo R, Gruol DJ & Evans RM. 1986. The c-erb-A gene encodes a thyroid hormone. *Nature*. **324** 641-646.
- Yen PM. 2001 Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiological Review* **81** 1097-142.
- Zago LB, Dupraz H, Sarchi MI & Rio ME. 2002. The molar ratio of retinol-binding protein to transthyretin in the assessment of vitamin A status in adults. Proposal of a cut-off point. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. **40** 1301-7.



### **II.3. CONCLUSION**

Dans une première étude biomédicale, nous avons mis en évidence des variations, dues à l'âge, de l'expression des récepteurs nucléaires des rétinoïdes et des HT perceptibles dans les cellules mononucléées du sang.

Les objectifs de la deuxième étude biomédicale étaient d'étudier les conséquences d'une hypothyroïdie bien établie sur les voies de signalisation de la T3 et de l'AR dans les PBMC humains. Nos résultats font apparaître que l'hypothyroïdie s'accompagne, chez l'homme, de la diminution significative de l'expression de TR $\beta$ , mais aussi de RAR $\alpha$  et de RAR $\gamma$  dans les PBMC.

Cette étude confirme ce que nous avons montré dans la précédente étude, réalisée sur les sujets âgés, à savoir que les cellules mononucléées du sang constituent un compartiment tissulaire dans lequel les conséquences fonctionnelles des variations du statut thyroïdien sont mesurables.

De plus, une hypothyroïdie induite par thyroïdectomie entraîne des modifications de l'action nucléaire de l'AR, modifications dont on peut supposer qu'elles ne se cantonnent pas aux PBMC mais concernent probablement tous les tissus cibles.

Enfin, nous pouvons souligner les similitudes de résultats obtenus chez les sujets âgés et chez les patients hypothyroïdiens ; similitudes qui renforcent l'idée que le déclin du "statut" thyroïdien est un phénomène de première importance au cours du vieillissement.



**CHAPITRE IV**

***DISCUSSION GENERALE***





## **CHAPITRE IV : DISCUSSION GENERALE**

### **I. ETUDES EXPERIMENTALES**

Des données bibliographiques ainsi que les résultats obtenus au laboratoire nous ont conduit à formuler une hypothèse qui suggère qu'un niveau optimum d'activité de la voie d'action des rétinoïdes est nécessaire au bon déroulement de certains processus neurobiologiques et cognitifs dans le cerveau adulte. La mise en évidence de la correction d'un déficit de mémoire relationnelle chez les souris âgées traitées par l'AR a conforté cette hypothèse (Etchamendy et al., 2001).

Dans ce contexte, les objectifs de ce travail de thèse étaient (i) de mieux comprendre les conséquences neurobiologiques d'une hypoexpression de la voie de signalisation de l'AR rencontrée chez l'animal âgé et l'animal carencé en vitamine A et (ii) d'expliquer la perte d'efficacité du traitement par l'AR sur l'expression de la neurogranine dans le cerveau des souris carencées en vitamine A.

#### **I.1. RAPPEL DES PRINCIPAUX RESULTATS**

Dans une première étude expérimentale, nous avons éprouvé notre hypothèse de travail qui suggérait que l'altération de la voie d'action de la T3 pouvait contribuer à la perte d'efficacité de traitement par l'AR chez des animaux carencés en vitamine A.

L'hypoactivité de la voie de signalisation des rétinoïdes, consécutive à la carence en vitamine A, est caractérisée par la diminution de l'expression des récepteurs nucléaires de l'AR (RAR $\beta$ , RXR $\beta/\gamma$ ) dans le cerveau. Les animaux carencés présentent aussi une hypoactivité de la voie d'action de la T3 caractérisée par la diminution du taux d'expression des TR $\alpha/\beta$ . Par voie de conséquence, l'expression de deux gènes cibles, régulés par l'AR et la

T3, codant pour des protéines impliquées dans les phénomènes de plasticité synaptique - tTG et RC3 - est elle aussi diminuée dans le cerveau (**Figure 9**).

L'administration d'AR augmente l'expression de ses propres récepteurs (autorégulation) et s'accompagne d'une augmentation de l'expression d'un gène cible codant pour la tTG. En revanche, ce traitement reste sans effet sur l'expression des TR $\alpha/\beta$  (hétérorégulation) et ne permet pas la restauration de l'expression de RC3.

L'administration de T3, quant à elle, permet non seulement l'activation de sa propre voie d'action (autorégulation des TR $\alpha/\beta$ ), mais aussi celle de l'AR et de l'expression des deux gènes cibles étudiés (tTG et RC3).

Ces résultats suggèrent qu'un état "d'hypothyroïdie cellulaire" s'établit avec la carence vitaminique A et qu'il pourrait contribuer à la perte d'efficacité du traitement par l'AR.

Compte tenu du fait que le vieillissement s'accompagne également d'une baisse de l'activité des voies d'action de l'AR et de la T3, nous avons cherché à savoir si un tel phénomène était aussi envisageable chez des animaux âgés.

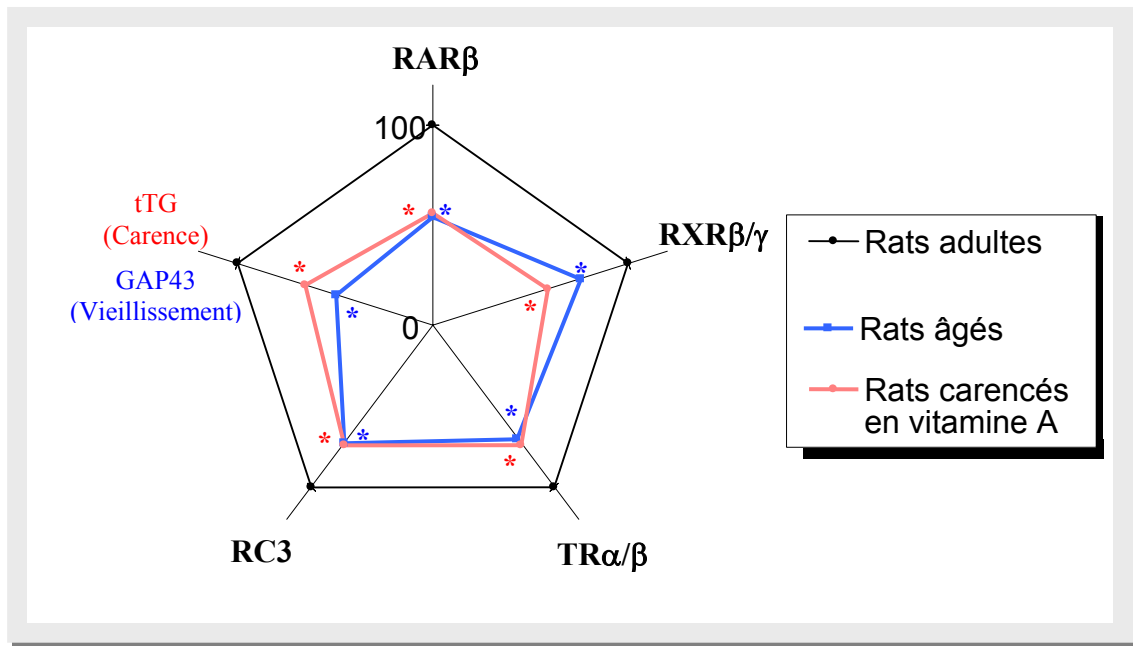
Dans ce but et dans la seconde partie de ce travail, nous avons comparé les effets d'administrations d'AR ou de T3 sur l'activité de leur voies de signalisation dans le cerveau et le foie d'animaux âgés.

Les résultats obtenus sont à rapprocher de ceux déjà décrits lors d'une carence en vitamine A. Ainsi, le vieillissement génère une hypoeexpression des récepteurs nucléaires de l'AR et de la T3. Au plan neurobiologique, il apparaît une baisse d'expression de deux gènes cibles de l'AR impliqués dans la plasticité synaptique (GAP43 et RC3) (**Figure 9**).

Par ailleurs, nos résultats montrent que l'administration de T3 est suffisante à elle seule pour réinduire les deux voies de signalisation et l'expression de RC3, alors que l'administration d'AR ne réactive que sa propre voie d'action. Le striatum semble particulièrement sensible à l'administration de T3.

Enfin, les résultats obtenus dans le foie des animaux âgés révèlent que le vieillissement s'accompagne de la diminution de la capacité maximale de liaison (C<sub>max</sub>) des RAR et TR ainsi que de la baisse des ARNm des RAR $\beta$  et TR $\alpha/\beta$ . Les activités enzymatiques de la tTG et de l'enzyme malique (ME) sont fortement abaissées dans le foie des rats âgés.

L'administration d'AR permet d'activer la voie d'action des rétinoïdes (Cmax des RAR et activité de la tTG) mais est sans effet sur l'activité de la ME. En revanche, l'administration de T3 permet, quant à elle, de "normaliser" l'activité hépatique de la ME qui était abaissée chez les animaux âgés.



**Figure 9 : Variation de l'expression des récepteurs de l'AR et de la T3 et de certains gènes cibles dans le cerveau de rats âgés ou carencés en vitamine A**

\*significativement différent des rats témoins, à  $p < 0.05$

## **I.2. LE VIEILLISSEMENT ET LA CARENCE VITAMINIQUE A SONT DEUX SITUATIONS QUI INDUISENT UNE BAISSÉ SIMULTANÉE DE L'ACTIVITÉ DES VOIES D'ACTION DE L'ACIDE RÉTINOÏQUE ET DE LA TRIODOTHYRONINE**

Les résultats obtenus chez les animaux âgés sont, pour la plupart, comparables à ceux obtenus chez les rats carencés en vitamine A. Ainsi, nous discuterons l'ensemble des effets liés au vieillissement, tout en faisant le lien avec les effets d'une carence en vitamine A. Ce

modèle a été adopté pour induire une hypoexpression de la voie d'action des rétinoïdes comparable à celle observée au cours du vieillissement.

Le vieillissement s'accompagne d'une baisse de l'activité de la voie de signalisation de l'AR, se traduisant par une baisse du taux des ARNm des récepteurs nucléaires RAR $\beta$  et RXR $\beta/\gamma$  dans le cerveau des animaux âgés. Des données similaires concernant l'expression des RAR $\beta$  ont déjà été décrites dans le cerveau de rats ou souris âgé(e)s ou carencé(e)s en vitamine A (Verma et al., 1992 ; Yamagata et al., 1993 ; Enderlin et al., 1997a, b ; Etchamendy et al., 2001). Comme nous l'avons précisé dans l'introduction bibliographique (chapitre I), les récepteurs RAR, et notamment les RAR $\beta$ , sont régulés positivement par l'AR (autorégulation) (De Thé et al., 1989; Haq et al., 1991). En ce qui concerne les RXR, des études réalisées *in vivo* ont permis de montrer leur régulation positive par l'AR (Enderlin et al., 1997 ; Etchamendy et al., 2001).

Ainsi, l'hypoexpression des récepteurs nucléaires de l'AR dans le cerveau des animaux âgés pourrait en partie résulter d'une diminution de la biodisponibilité intracellulaire en AR. Des données bibliographiques cohérentes rapportent une "dérégulation" avec l'âge du métabolisme de la vitamine A (mobilisation du rétinol réduite), et en particulier de son activation métabolique (biosynthèse de l'AR affectée avec l'âge) (Borel et al., 1998 ; Idres et al., 2002 ; Pinaire et al., 2003).

Nos résultats montrent aussi, chez l'animal âgé ou chez le rat carencé en vitamine A, des altérations de la voie de la T3, traduites notamment par une baisse du taux des ARNm des TR $\alpha/\beta$ . Des résultats semblables avaient déjà été décrits au laboratoire (Enderlin et al., 1997a,b ; Etchamendy et al., 2001). La diminution de l'expression des TR $\alpha/\beta$  pourrait elle aussi traduire une biodisponibilité réduite en T3 dans la cellule, puisqu'il est connu que les TR sont régulés positivement par leur ligand (Lebel et al., 1993 ; Baas et al., 1998).

Chez les animaux âgés utilisés dans ce travail, nous avons mesuré une baisse faible (-10%) et néanmoins significative de la concentration en T3 totale dans le sang. Ce résultat renforce l'idée selon laquelle la baisse de l'expression des TR avec l'âge résulterait d'une biodisponibilité réduite en ligand.

Dans l'ensemble, ces données soulignent que le vieillissement et la carence en vitamine A s'accompagnent de l'hypoactivité concomitante des voies d'action des rétinoïdes et des HT dont les interactions ne sont plus à démontrer (Garcin et Higuieret, 1980 ; Higuieret et Garcin, 1982 et 1984 ; Jones et al., 1993 ; Mano et al., 1993 ; Satyanarayana et al., 1994).

### **I.3. LE STATUT THYROÏDIEN INFLUENCE L'EFFICACITE D'UN TRAITEMENT PAR L'ACIDE RETINOÏQUE**

L'administration d'AR à des animaux âgés, présentant une hypoexpression de la voie d'action des rétinoïdes, permet de corriger ce déficit. En effet, l'administration d'AR provoque une augmentation de l'expression de ses propres récepteurs : RAR $\beta$  et RXR $\beta/\gamma$ . Un phénomène comparable a déjà été décrit au laboratoire et par d'autres auteurs dans le cerveau de rats ou souris âgé(e)s ou carencé(e)s en vitamine A traité(e)s par l'AR (Kato et al., 1992 ; Yamagata et al., 1993 ; Enderlin et al., 1997a,b ; Etchamendy et al., 2001).

Dans nos conditions expérimentales et contrairement à ce que nous avons obtenu précédemment chez l'animal âgé, l'administration d'AR n'a pas provoqué l'augmentation de l'expression des TR $\alpha/\beta$ . Ces résultats obtenus *in vivo* sont difficiles à interpréter à la lumière des données de la littérature. En effet, elles concernent essentiellement des études *in vitro* qui révèlent une régulation des TR par l'AR, positive ou négative selon les isoformes des récepteurs (Perez et al., 1991 ; Jones et al., 1993 ; Satyanarayana et al., 1994). En revanche, cette hétérorégulation a été mise en évidence plusieurs fois dans le laboratoire, dans différentes situations nutritionnelle et hormonale et dans plusieurs tissus cibles (Pallet et al., 1997 ; Enderlin et al., 1997a,b).

L'hypothyroïdie génère l'apparition d'aporécepteurs (récepteurs de la T3 sans ligand) qui se comportent comme des récepteurs transdominants et répriment la transcription génique (Sachs et al., 2002; Makowski et al., 2003 ; Chassande, 2003). Ainsi, la baisse liée à l'âge de la concentration intracellulaire en T3 entraîne l'animal vieillissant vers un état "d'hypothyroïdie cellulaire" qui pourrait contribuer à une plus forte proportion d'aporécepteurs TR, ce qui entraînerait le "blocage" de la transcription d'un certain nombre de gènes, dont ceux codant pour les récepteurs de l'AR et leurs gènes cibles (Mano et al., 1993 ; Iñiguez et al., 1993).

Des résultats semblables ont été obtenus dans les études menées sur l'expression et la capacité maximale de liaison (C<sub>max</sub>) des RAR et TR dans le foie des animaux âgés. En effet, l'AR n'a d'effet que sur l'hypoexpression de ses propres récepteurs nucléaires et ne permet pas de restaurer celle des TR. Par ailleurs, ces résultats sont à rapprocher de ceux décrits par Pallet et al. (1994) qui ont montré que l'AR régulait différemment les TR selon le statut thyroïdien des animaux.

Dans ce travail, les résultats obtenus chez l'animal âgé sont en partie contraires à ceux que nous avons déjà publiés (Enderlin et al., 1997a,b ; Pallet et al., 1997), puisque l'AR a perdu sa capacité d'hétérorégulation sur la voie d'action de la T3. Ce phénomène nous a surpris et nous avons cherché à l'expliquer.

Au préalable, il est important de préciser qu'il est aujourd'hui bien admis que le vieillissement est un phénomène hétérogène, qui débute plus ou moins tôt selon les individus, et se poursuit à des vitesses variables. C'est pourquoi les statuts physiologiques d'animaux de même âge peuvent être différents, ce qui permet de dire que l'âge "chronologique" ne reflète pas fidèlement l'âge "physiologique". En effet, dans nos séries expérimentales, l'activité de la tTG est baissée de plus de 50%, et l'activité de la ME de près de 70% chez les animaux âgés. Chez les rats carencés en vitamine A, une baisse des activités de la tTG dans le cerveau et de la ME dans le foie a également été observée (-40% et près de -50% respectivement). Les résultats obtenus précédemment au laboratoire font état de seulement 26% de diminution de l'activité ME hépatique chez des rats âgés de 23-24 mois par rapport aux témoins. Ces résultats nous incitent à penser que la voie de signalisation des HT est plus gravement affectée avec l'âge ou suite à une carence en vitamine A dans nos expériences que dans les expériences précédentes.

Ainsi, nous pouvons suggérer que, lorsqu'elle atteint un niveau critique, la baisse d'activité de la voie de signalisation de la T3, observée au cours du vieillissement ou lors d'une carence en vitamine A, devient un facteur "limitant", empêchant l'action régulatrice de l'AR sur la voie d'action des HT. La baisse de la concentration plasmatique en T3 avec l'âge est un argument en faveur de cette hypothèse.

Par ailleurs, l'administration de T3 a permis de "normaliser" le taux des ARNm de ses propres récepteurs nucléaires (TR $\alpha/\beta$ ) chez les rats âgés présentant une hypoexpression de ces récepteurs. Ces résultats sont en accord avec l'autorégulation des TR par leur ligand décrite par plusieurs auteurs (Lebel et al., 1993 ; Baas et al., 1998). Des données obtenues au laboratoire ont montré que le gène codant pour les TR $\alpha/\beta$  est régulé positivement par la T3 dans le foie de rats rendus hypothyroïdiens (Coustaut et al., 1996).

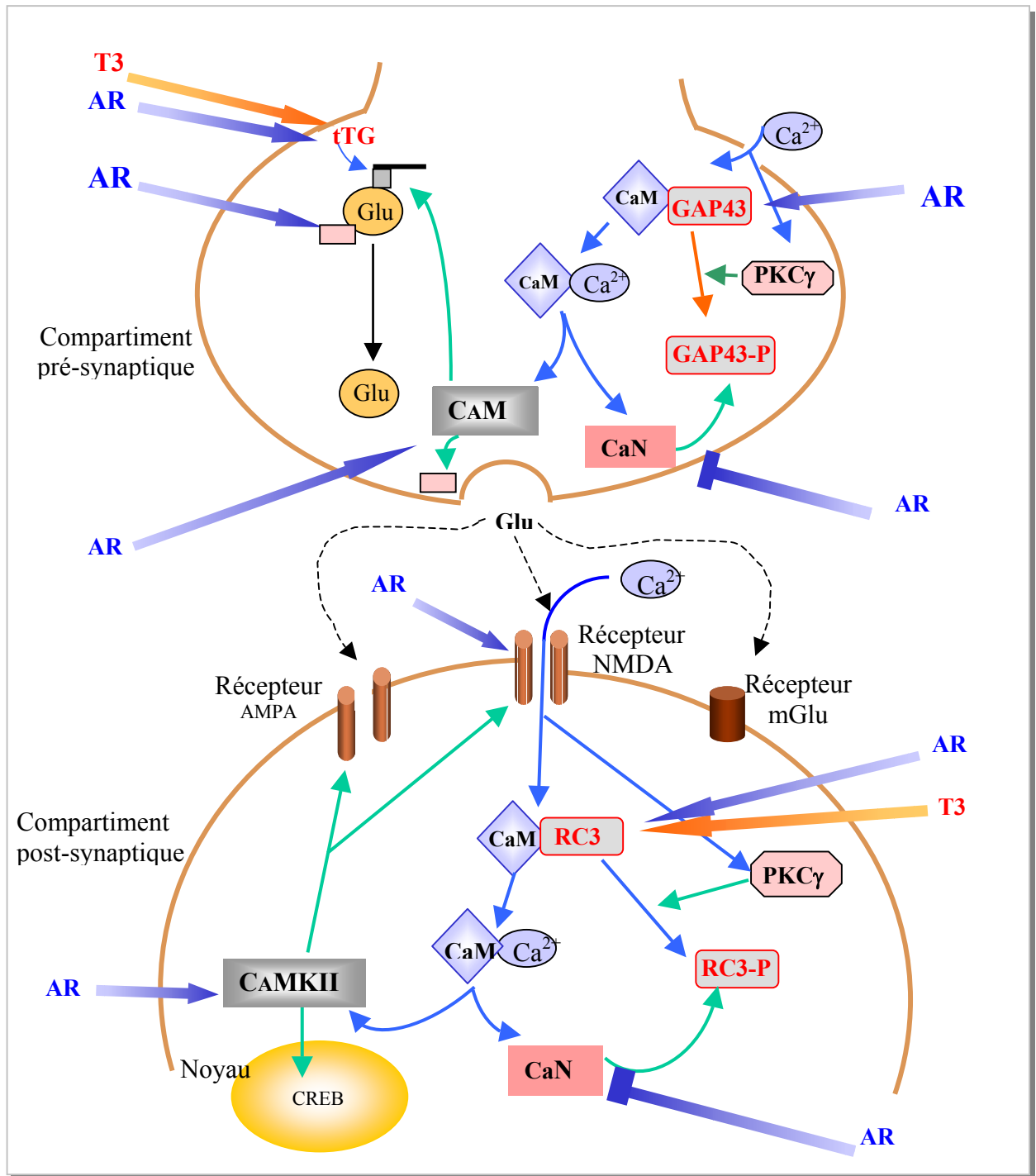
L'administration de T3 permet d'activer aussi la voie de l'AR (augmentation des RAR $\beta$  et RXR $\beta/\gamma$ ) dans le cerveau. Cette hétérorégulation a déjà été observée au laboratoire dans différents organes, et dans différentes situations hormonales (Higueret et al., 1992 ; Coustaut et al., 1996 ; Enderlin et al., soumis). D'autres auteurs ont montré une régulation des

RXR par la T3, positive ou négative selon les isoformes (Mano et al., 1993). De manière comparable à ce que nous avons suggéré précédemment, l'administration de T3 pourrait réduire le nombre d'apoptoseurs TR dans les cellules et ainsi permettrait de "débloquer" l'expression d'un certain nombre de gènes dont ceux impliqués dans la voie d'action de l'AR.

#### **I.4. L'HYPOACTIVITE DES VOIES D'ACTION DE L'ACIDE RETINOÏQUE ET DE LA TRIODOTHYRONINE CONTRIBUE A L'APPARITION DE CERTAINS TROUBLES NEUROBIOLOGIQUES LIES AU VIEILLISSEMENT**

Les conséquences neurobiologiques de l'hypoactivité de la voie d'action de la vitamine A et des HT sont potentiellement très étendues puisque l'AR et les HT jouent des rôles essentiels dans le cerveau adulte, notamment dans les processus neurobiologiques et cognitifs (Chiang et al., 1998 ; Cocco et al., 2002 ; revue dans Smith et al., 2002). C'est pourquoi ce travail visait à mieux comprendre les conséquences fonctionnelles d'une hypoactivité de la voie d'action de l'AR mais aussi de la T3 sur l'expression de certains de leurs gènes cibles impliqués dans la plasticité synaptique. Il est en effet admis que le renforcement des connexions synaptiques ainsi que la formation des nouvelles synapses puissent être à l'origine de l'amélioration du phénomène de PLT et des capacités mnésiques (Moser, 1999 ; Gazzaley et al., 2002). Parmi les gènes régulés par l'AR et la T3, la neurogranine (RC3), la neuromoduline (GAP43) et la transglutaminase tissulaire (tTG) ont particulièrement retenu notre attention (Friedrich et al., 1991 ; Pak et al., 2000 ; Routtenberg et al., 2000). En effet, il existe des relations fonctionnelles avec d'autres protéines codées par des gènes cibles des rétinoïdes et des HT, comme la protéine kinase CaM/Ca<sup>2+</sup> dépendante de type II (CaMKII) (Chen et Kelly, 1996), le récepteur NMDA (Beczowska et al., 1996) et la calcineurine (Spannaus-Martin et Martin, 2000).

Quelques niveaux d'intervention des rétinoïdes et des hormones thyroïdiennes, recensés à partir de données bibliographiques, sont résumés sur la **figure 10**.



**Figure 10 : Schéma récapitulatif des différents niveaux d'intervention des rétinoïdes et des hormones thyroïdiennes au niveau d'une synapse**

○ Vésicule synaptique    □ Synaptophysine    □ Synapsine    — Actine  
➔ Régulation positive par l'AR    ➔ Régulation positive par la T3  
⊥ Régulation négative par l'AR

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



Chez les rats âgés, la baisse de l'expression des récepteurs nucléaires de l'AR et de la T3 conduit à une diminution de l'expression des gènes cibles RC3 et GAP43 (ARNm et protéines) dans le cerveau entier et dans différentes régions cérébrales. Ainsi, la diminution de l'expression de GAP43 avec l'âge, notamment dans le champ CA3 de l'hippocampe, a déjà été mise en évidence par Casoli et al. (2001). L'expression de RC3 quant à elle est significativement baissée dans l'ensemble des zones étudiées (sous-régions de l'hippocampe, cortex cérébral, et striatum). Ces résultats sont cohérents avec les données de la littérature qui montrent que les rétinoides pourraient jouer un rôle important non seulement dans l'hippocampe mais aussi dans le striatum. En effet, l'expression spatio-temporelle des protéines de liaison, des enzymes de métabolisation et des récepteurs des rétinoides (notamment le RAR $\beta$ ) est particulièrement importante dans le striatum (Thompson Haskell et al., 2002).

Nos études, *in vivo*, montrent pour la première fois que l'administration d'AR provoque une augmentation de l'expression de GAP43 chez l'animal âgé. Ceci est en accord avec les nombreuses données *in vitro* qui ont mis en évidence une régulation positive de GAP43 par l'AR (Encinas et al., 2000 ; Kim et al., 2000 ; Mani et al., 2000 ; Anderson et al., 2001) ainsi qu'une corrélation positive entre l'expression des récepteurs RAR $\beta$  et de GAP43 (Grummer et Zachman, 2000). En revanche, contrairement à ce qui avait été observé chez d'autres animaux âgés (Enderlin et al., 1997a,b), l'administration d'AR n'a pas permis de restaurer l'expression de RC3, et ceci malgré la présence d'un élément de réponse à l'AR dans son gène (Iñiguez et al., 1994).

L'administration de T3 aux animaux âgés permet la "restauration" de l'expression des deux gènes cibles étudiés. Plus précisément, nos expériences montrent que le striatum est une zone particulièrement sensible à l'administration de T3. Ceci est en accord avec des données de la littérature qui ont montré que l'expression de RC3 est modulée par les HT dans le striatum, dans des situations d'hypothyroïdie et/ou après traitement par ces hormones, au cours du développement ou chez l'adulte (Iñiguez et al., 1992 ; Iñiguez et al., 1993 ; Piosik et al., 1995 ; Iñiguez et al., 1996 ; Guadaño-Ferraz et al., 1997).

La carence en vitamine A s'accompagne également d'une baisse de l'expression de RC3 et GAP43 (ARNm et protéines) dans le cerveau. Des travaux ultérieurs menés au laboratoire ont montré que l'expression de RC3 et GAP43 était fortement diminuée dans le striatum (Husson et al., 2004). Les effets des administrations (AR ou T3) sur l'expression de RC3 sont comparables à ceux observés chez le rat âgé et soulignent la sensibilité du striatum à

une déficience en vitamine A. En revanche, ces résultats diffèrent de ceux obtenus chez la souris carencée puisqu'une baisse de l'expression de RC3 (et de RXR $\beta/\gamma$ ) avait été observée dans l'hippocampe chez ces animaux (Etchamendy et al., 2001). Nous pouvons suggérer que les répercussions neurobiologiques associées à la carence vitaminique A apparaissent d'abord dans le striatum, du fait de l'importance de cette région pour la voie des rétinoïdes, puis atteindraient l'hippocampe si la carence se prolonge.

Il est admis que l'hippocampe et le striatum sont deux régions cérébrales impliquées dans des systèmes de mémoire différents. Selon la définition des différents systèmes de mémoire à long terme décrits par Squire (1998) les stratégies déclaratives (capacité consciente à retrouver des faits et des événements : mémoire épisodique et sémantique) nécessitent une flexibilité importante et impliquent l'hippocampe, alors que les stratégies procédurales (apprentissage inconscient des habiletés motrices ou des comportements : mémoire des habitudes) peu flexibles, impliquent le striatum (Kandel et Pittenger, 1999 ; Redish, 2001 ; revue dans Packard et Knowlton, 2002). Selon les situations d'apprentissage, les différents systèmes de mémoire, notamment ceux dépendants du striatum et de l'hippocampe, peuvent agir indépendamment, en interaction ou en compétition. Ainsi, une influence réciproque des systèmes de mémoire a pu être mise en évidence (D'Hooge et De Deyn, 2001 ; Fasano et Brambilla, 2002 ; Miyoshi et al., 2002 ; Poldrack et Packard, 2003). Ces données montrent que l'hippocampe et le striatum ne peuvent être dissociés dans leur intervention dans certains processus neurobiologiques qui sous-tendent les capacités mnésiques. C'est pourquoi il est probable d'envisager que les atteintes neurobiologiques du vieillissement ou de la carence en vitamine A dans le striatum dorsal (enrichi en RC3) pourraient contribuer à la genèse des déficits de mémoire relationnelle (déclarative) observés chez les animaux âgés ou carencés (Etchamendy et al., 2001 et 2003).

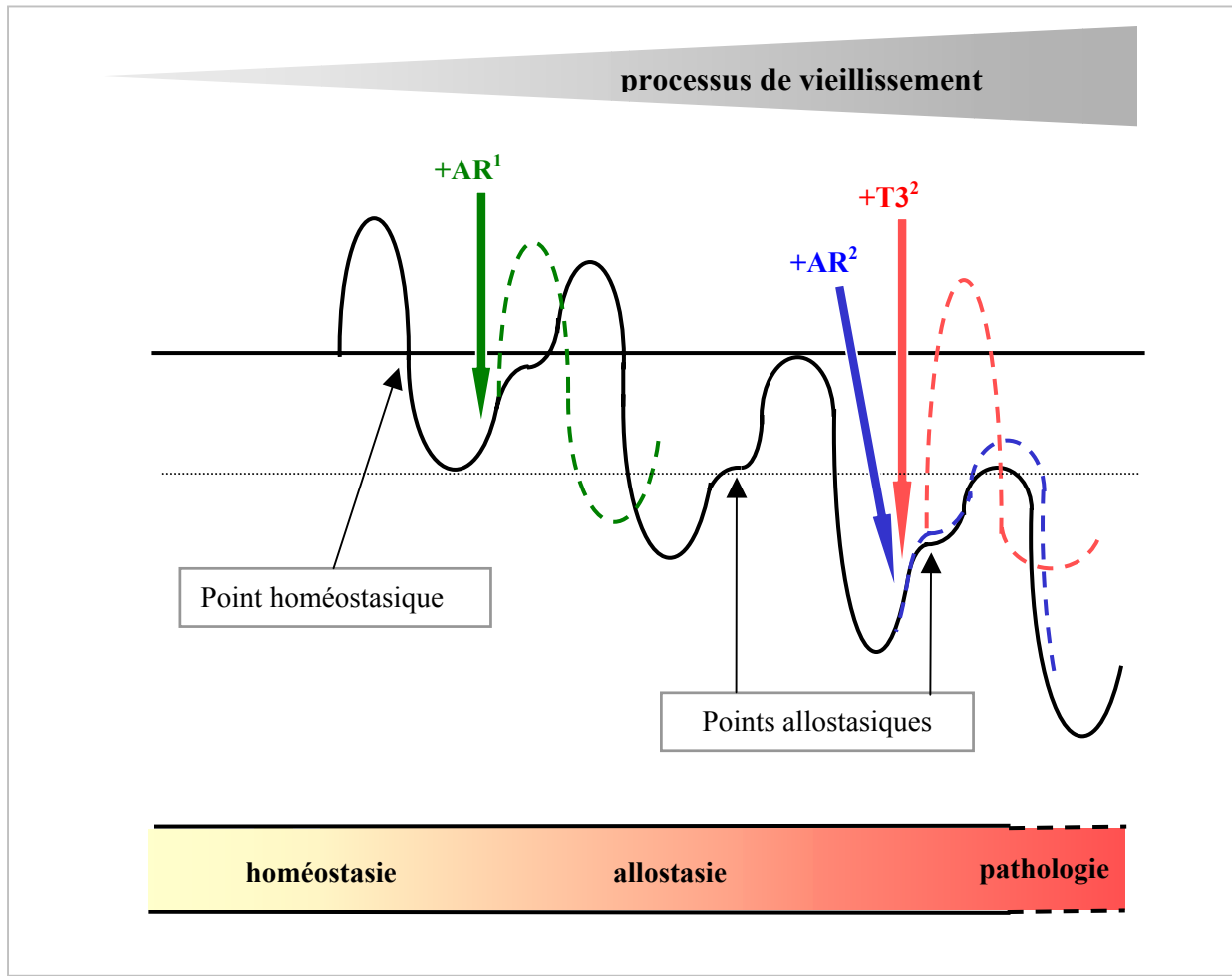
### **I.5. QUELS PROCESSUS ADAPTATIFS SE METTENT EN PLACE AU COURS DU VIEILLISSEMENT ?**

Ces différentes données expérimentales sont cohérentes avec le fait que le vieillissement s'accompagne d'une hypoactivité des voies d'action de l'AR et de la T3. Nos résultats montrent aussi que l'administration d'AR à des animaux âgés (ou carencés en vitamine A) n'entraîne qu'une restitution partielle des différents paramètres étudiés. En effet, dans nos conditions expérimentales, les effets de l'AR ne s'exercent pas sur la voie de

signalisation de la T3. Ce résultat suggère qu'il apparaît, au cours du vieillissement, des modifications dans les relations entre les voies d'action de l'AR et de la T3 et l'organisme doit mobiliser un ensemble de processus adaptatifs pour compenser la baisse de disponibilité d'AR et de T3. Le vieillissement de l'individu se caractérise alors par une baisse progressive de ses capacités d'adaptation et par la diminution de la flexibilité de ses mécanismes de régulation qui entraînent l'organisme âgé vers la pathologie. Au plan théorique, il est important de souligner qu'à un niveau intermédiaire (allostasie), des possibilités d'intervention persistent encore pour "récupérer" certaines capacités fonctionnelles. En effet, au cours du vieillissement (ou de la carence vitaminique A), la voie d'action de la T3 devient un élément essentiel de ces processus adaptatifs et sa réactivation permet de supprimer certains processus neurobiologiques.

En résumé, nos résultats semblent indiquer que les processus adaptatifs qui accompagnent le vieillissement cérébral (ou une carence vitaminique A), conduisent à un nouvel état dans lequel la nature des relations entre les voies d'action de l'AR et de la T3 change. Cet état adaptatif est qualifié d'allostasie par certains auteurs pour le différencier de l'état homéostatique initial (Sterling et Eyer, 1988 ; McEwen et Wingfield, 2003) (**Figure 11**).

Dans cet état intermédiaire, un traitement adapté peut permettre la réactivation des voies de signalisation concernées mais ceci ne doit pas nous laisser penser que le système est revenu à son état homéostatique initial. Bien au contraire, lorsque la flexibilité des systèmes régulateurs atteint ses limites, l'organisme bascule dans la pathologie.



**Figure 11 : Schéma hypothétique de l'action de l'AR au cours des processus adaptatifs liés au vieillissement ou à une carence en vitamine A**

(d'après Koob, 2003)

L'hypothèse suggère que dans un premier temps, pendant la phase d'homéostasie, l'administration d'AR active les voies de signalisation de l'AR et de la T3, augmente l'expression des gènes cibles, et supprime les déficits mnésiques (cas des premières études sur le vieillissement)<sup>1</sup>. En revanche, dans nos expériences<sup>2</sup>, les processus adaptatifs conduisent à un nouvel état (allostasie) au cours duquel on observe une perte d'efficacité du traitement par l'AR sur l'induction des gènes cibles et sur l'hypoactivité de la voie d'action de la T3.

## **I.6. CONCLUSION PARTIELLE**

Dans la partie expérimentale de ce travail de thèse, nous avons voulu préciser l'intervention des rétinoïdes et des hormones thyroïdiennes dans les phénomènes moléculaires qui sous-tendent la plasticité synaptique. Nos résultats soulignent la prédominance de l'hormone thyroïdienne T3 dans la régulation de RC3 en situation d'hypoexpression de la voie d'action de la vitamine A. La baisse d'activité de la voie de T3 pourrait être un facteur limitant, empêchant l'action régulatrice de l'AR sur RC3. Ces données apportent de nouveaux arguments concernant les réponses adaptatives qui accompagnent les processus du vieillissement. En effet, au-delà d'un certain niveau de compensation, seule l'administration de T3 permet la réactivation des voies de signalisation de l'AR et de la T3. Par ailleurs, une carence vitaminique A a des conséquences sur les voies d'action de l'AR et de la T3 comparables à celles observées chez des animaux âgés. Les capacités de réinduction de l'AR semble également dépendre du statut thyroïdien de l'animal carencé.

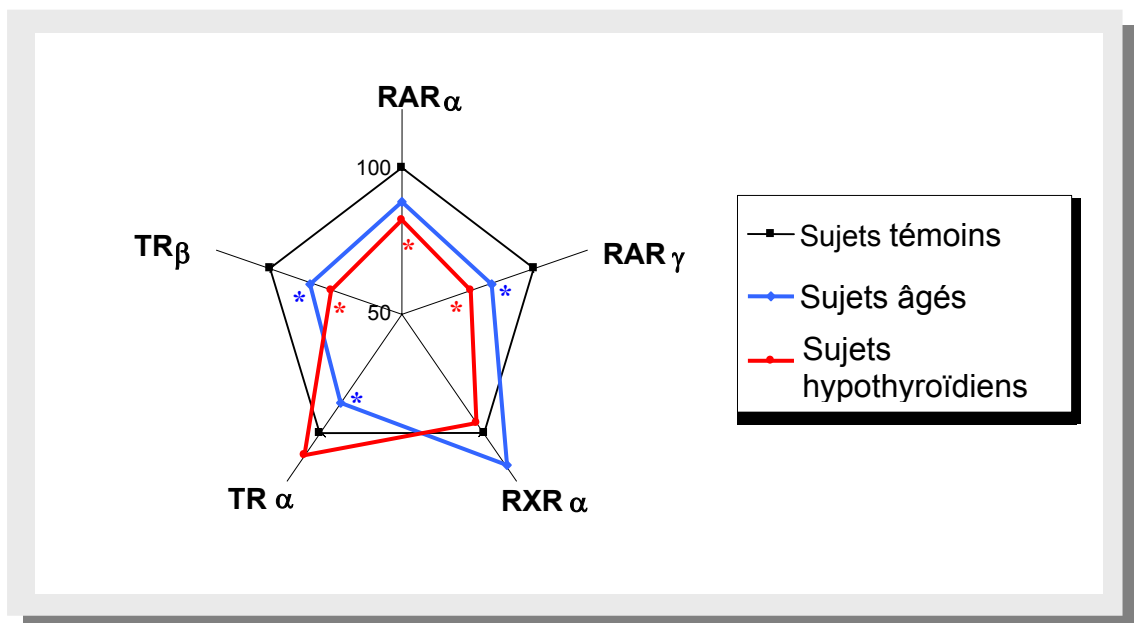
Ces résultats confortent notre hypothèse de travail selon laquelle un niveau optimum d'activité de la voie d'action des rétinoïdes est essentiel à un fonctionnement optimum des processus neurobiologiques qui sous-tendent les capacités mnésiques. Par ailleurs, des études récentes suggèrent que les récepteurs nucléaires pourraient constituer, au cours du vieillissement, une cible thérapeutique potentielle. Nos données semblent indiquer que le statut thyroïdien devrait également être pris en considération dans la définition de ces traitements.

Pour conforter ces hypothèses de travail, des données devraient être acquises chez l'homme. C'est la raison pour laquelle nous avons initié des études biomédicales qui sont présentées dans la deuxième partie de ce chapitre.



## II. ETUDES BIOMEDICALES

Dans la seconde partie de ce travail de thèse nous avons éprouvé nos hypothèses chez l'homme en réalisant deux études biomédicales. L'objectif de la première étude clinique était d'étudier les conséquences du vieillissement sur les voies d'action nucléaires de l'AR et de la T3 en utilisant les cellules mononucléées du sang. Dans la deuxième étude biomédicale, nous avons abordé les conséquences d'une hypothyroïdie, sur ces mêmes voies. Cette approche menée dans les cellules mononucléées du sang chez l'homme, nous a permis (i) de valider l'utilisation de ces cellules pour suivre les modifications d'expression des récepteurs nucléaires en réponse à des modifications du statut hormonal, (ii) de montrer que chez l'homme, comme cela a été décrit chez l'animal, le vieillissement s'accompagne d'altérations des voies de signalisation nucléaires de l'AR et de la T3, et (iii) de mettre en évidence de fortes similitudes entre les effets du vieillissement et ceux de l'hypothyroïdie ; similitudes qui étayaient l'hypothèse de la prépondérance du déclin de la fonction thyroïdienne avec l'âge. C'est ce dernier point que nous discutons maintenant.



\* différence significative par rapport aux témoins ( $p < 0.05$ )

**Figure 12 : Variation de l'expression de différents sous-types de récepteurs nucléaires de l'AR et de la T3 dans les PBMC de sujets âgés et hypothyroïdiens**

## **COMPARAISON DES EFFETS DE L'ÂGE ET DE L'HYPOTHYROÏDIE CHEZ L'HOMME**

Des dysfonctionnements du système endocrinien et plus particulièrement de la glande thyroïde ont été fréquemment décrits chez les personnes âgées (Levy, 1991 ; Mooradian, 1993a,b ; Finucane et Anderson, 1995 ; Canaris et al., 2000). Il apparaît que les troubles thyroïdiens du sujet âgé relèvent plus fréquemment de l'hypothyroïdie dont la prévalence varie considérablement selon les études (de 0.9 à 17.5%), même si les symptômes souvent discrets sont difficiles à différencier du vieillissement normal (Diez, 2002 et 2003). De plus, Chakraborti et al. (1999) ont émis l'hypothèse que le vieillissement s'accompagnait d'altérations complexes du statut thyroïdien au-delà de 60 ans.

Dans notre étude, l'hypothyroïdie se caractérise par une forte hausse de la concentration de la TSH plasmatique, associée à une complète disparition (au sens où elles deviennent indétectables) des hormones circulantes T4 et T3. Par ailleurs, l'hypothyroïdie est associée à une augmentation du rétinol sérique, caractéristique d'une dérégulation de l'homéostasie de la concentration en rétinol sanguin, qui a déjà été observée par d'autres auteurs (Goswami et Choudhury, 1999). Les sujets âgés quand à eux ne présentent pas de modification significative du taux de rétinol sanguin même si un tel phénomène a par ailleurs été décrit comme survenant avec l'âge (Mecocci et al., 2000). En revanche, il est à noter que le statut thyroïdien des sujets âgés est comparable à celui des patients hypothyroïdiens puisqu'ils présentent aussi, dans une moindre mesure, une augmentation de la TSH plasmatique et une tendance à la diminution de la T3 libre sans modification de la T4 libre. Ces symptômes ont été décrits comme étant révélateurs d'une hypothyroïdie subclinique (revue dans Samuels, 1998 ; Andersen et al., 2003).

L'étude biomédicale portant sur les patients hypothyroïdiens a montré que l'expression des RAR $\gamma$  et des RAR $\alpha$  était significativement diminuée, dans les PBMC, par rapport aux individus plus jeunes. Ce travail a permis de mettre en évidence pour la première fois que, bien que sujets à une hausse de leur concentration en rétinol circulant, ces patients présentent un hypofonctionnement de la voie de signalisation nucléaire de l'AR, connu comme étant associé, dans la littérature, à un état de carence en vitamine A, et nous conduisant à conclure, à leur égard, à une altération de leur statut vitaminique A.



Les sujets âgés présentent des altérations tout à fait comparables puisque l'expression des ARNm de RAR $\gamma$  est diminuée dans leurs PBMC sans qu'une baisse de la concentration en rétinol sérique ne soit repérée et puisse le laisser prévoir.

Ainsi chez les uns comme chez les autres, tout se passe comme si des modifications de la fonction thyroïdienne - majeures dans le cas d'une thyroïdectomie, moins évidentes lorsqu'elles se superposent au vieillissement - entraînaient des modifications de la biodisponibilité nucléaire en AR, dont la diminution de l'expression des récepteurs nucléaires est un indicateur. La disparition, chez les sujets âgés aussi bien que chez les patients hypothyroïdiens, d'une corrélation, positive et significative, existante chez les témoins, entre rétinol sérique et expression des récepteurs nucléaires, tend à confirmer que les altérations surviennent au niveau cellulaire. Ces résultats sont, par ailleurs, cohérents avec ceux de Berggren-Soderlund et al. (2003) qui montrent que la concentration en rétinol sérique ne reflète pas fidèlement la biodisponibilité intracellulaire en AR.

Enfin, il est important de noter que chez les sujets âgés une hausse importante du ratio RBP:TTR, liée à la baisse de la concentration sérique en TTR, sont également des manifestations d'une dérégulation du métabolisme de la vitamine A survenant avec l'âge (Rosales et Ross, 1998 ; Zago et al., 2002).

Notre étude montre que chez l'homme, une hypothyroïdie sévère induit un hypofonctionnement de la voie d'action nucléaire des HT, qui se concrétise par une hypoexpression des ARNm des TR $\beta$  dans les PBMC. Cette diminution d'expression est cohérente avec la diminution considérable de la concentration de T3 libre que nous observons chez ces patients puisque TR $\beta$  serait particulièrement sensible au niveau de son ligand (Lebel et al., 1993).

Nous montrons, en revanche, que l'âge qui n'induit qu'une très légère baisse de la concentration de T3 libre s'accompagne d'une hypoexpression des mêmes TR $\beta$  mais aussi des TR $\alpha$ . Sadow et al. (2003) ont plus récemment rapporté que l'autorégulation des TR par leur ligand dépend en fait des isoformes TR $\alpha$  et TR $\beta$  et interviendrait différemment en fonction du tissu. Néanmoins, la régulation hormonale des TR dans des lymphocytes humains avait déjà été montrée par Li et al. (1990) et suggère que la diminution de l'expression des TR avec l'âge dans les PBMC soit liée à une réduction de la biodisponibilité en hormone dans ces cellules. Là encore, la disparition, avec l'âge, de la corrélation entre l'expression de TR $\beta$  dans les PBMC et la concentration de T3 libre est en faveur de cette hypothèse. Par ailleurs,

Gauthier et al. (1999) et Bassett et al. (2003) ont montré que TR $\beta$  était le sous-type de récepteur le plus impliqué dans la régulation de la production de la TSH. Ainsi, la diminution de l'expression de cette isoforme de TR est en accord avec l'augmentation de la TSH plasmatique chez les sujets âgés.

Prises toutes ensemble, ces données mettent en évidence de grandes similitudes entre les effets de l'hypothyroïdie et du vieillissement sur l'action nucléaire des rétinoïdes et des hormones thyroïdiennes. Ces deux situations physiopathologiques, n'ayant pas grand rapport *a priori*, induisent, en effet, l'une et l'autre un hypofonctionnement caractérisé des voies de signalisation nucléaire de l'AR et de la T3. De plus, dans l'une et l'autre situations, les taux plasmatiques classiquement utilisés pour caractériser les statuts en vitamine A ou thyroïdien ne permettent pas de prévoir ce phénomène. Chez les individus âgés ces taux tendraient à caractériser une hypothyroïdie subclinique avec élévation de la concentration de TSH sans modification de la T4 sérique. Nos études semblent montrer que pour autant, même si la production d'hormone n'est que légèrement diminuée avec l'âge, à la différence de ce qui est induit par la thyroïdectomie, la fonctionnalité nucléaire de la T3 est altérée de manière importante. On peut suggérer que le temps soit un paramètre très important pour expliquer que le vieillissement ait des répercussions aussi importantes sur l'expression des récepteurs nucléaires que l'ablation de la glande thyroïde elle-même ; puisque, en effet, les individus hypothyroïdiens ne sont que depuis très peu de temps sujets à une hypothyroïdie très sévère, alors que les individus âgés sont en revanche sujets à une hypothyroïdie, certes beaucoup plus légère, mais dont l'installation s'est probablement faite progressivement au cours des années et vis à vis de laquelle leur organisme a mis en place des stratégies d'adaptation. On rejoint avec cette explication les hypothèses évoquées chez l'animal qui suggéraient que le vieillissement soit caractérisé par un état de "déficience" en vitamine A associé à une "hypothyroïdie tissulaire", qui peut être considérée comme un élément important de la réponse adaptative de l'organisme âgé.

## ***CONCLUSION***



## **CONCLUSION**

Dans un contexte plus général, notre 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 de certains nutriments dans le maintien, sinon l'amélioration d'un bon état de santé. Nos orientations de recherche s'inscrivent dans cette nouvelle perspective.

Les études menées chez l'animal carencé en vitamine A et chez l'animal âgé ont montré que ces deux situations entraînaient un hypofonctionnement comparable des voies d'action nucléaires des rétinoïdes et des hormones thyroïdiennes. Ces mêmes études ont également mis en évidence que, dans ces deux situations, des processus adaptatifs conduisent à un statut thyroïdien "limitant", puisque, à un certain stade, seule la T3 est à même de "normaliser" l'hypofonctionnement des voies de signalisation et permet également une récupération fonctionnelle, par l'activation des gènes impliqués dans la plasticité synaptique et altérés par la carence ou l'âge.

Les données issues des deux études biomédicales ont permis d'éprouver les hypothèses construites à partir des données expérimentales. Elles montrent pour la première fois que le vieillissement, chez l'homme, induit des modifications fonctionnelles des voies d'action des rétinoïdes et des hormones thyroïdiennes. Des résultats comparables ont été obtenus chez des patients hypothyroïdiens et suggèrent que ces modifications survenant avec l'âge soient, au moins en partie, dues à des altérations de la fonction thyroïdienne. Ces

observations, réalisées dans les cellules mononucléées du sang humain, sont à rapprocher de celles réalisées chez le rat âgé où nous avons montré que l'âge induit, dans le foie et le cerveau, une hypoactivité des voies de signalisation de l'AR et de la T3 et où seule l'administration de T3 permet la réactivation de ces voies. Ces données suggèrent que ces modifications de la signalisation "rétinoïdienne" ou thyroïdienne au niveau nucléaire se fassent en réponse à des modifications du statut hormonal (AR ou T3) et auraient probablement lieu dans tous les tissus cibles de l'organisme ; les répercussions fonctionnelles de ces phénomènes dépendant de l'organe considéré. La cohérence des données acquises dans le cerveau ou le foie de l'animal âgé, d'une part, et dans les PBMC de sujets âgés, d'autre part, nous conduisent à penser que les profils d'expression des récepteurs nucléaires dans les PBMC reflètent avec pertinence les profils d'expression des autres tissus cibles.

Dans ce contexte, si l'on considère les données faisant état de l'implication de la voie d'action des rétinoïdes dans la genèse des altérations cognitives liées à l'âge ou encore dans l'étiologie des formes tardives de la maladie d'Alzheimer, l'intérêt de nos résultats est de proposer les profils d'expression des récepteurs nucléaires dans les PBMC comme prédictifs des profils d'expression cérébraux, et à ce titre pouvant constituer des marqueurs moléculaires du risque d'altérations neurobiologiques.

Pour poursuivre ce travail, une étude consistera à déterminer les profils d'expression des récepteurs nucléaires de l'AR et de la T3 dans les PBMC de patients présentant des troubles de la mémoire déclarative ou des troubles de type "Alzheimer" et soumis à une évaluation précise de leurs performances cognitives. Ainsi, il devrait être possible de vérifier la relation entre les profils d'expression des récepteurs nucléaires de l'AR et de la T3 et les performances mnésiques.

Par ailleurs, les études expérimentales devront être poursuivies afin d'étudier les possibilités d'interventions, par voie nutritionnelle par exemple, qui pourraient permettre de différer, à défaut d'empêcher, la survenue des altérations des statuts vitaminique A ou thyroïdien avec l'âge. Il serait intéressant d'étudier, chez des animaux recevant des suppléments en vitamine A et/ou en iode dans leur alimentation, les effets du vieillissement sur les voies d'action nucléaires de l'AR et de la T3 et sur les performances cognitives. On peut en effet émettre l'hypothèse que ces interventions nutritionnelles, à partir de l'âge adulte par exemple, pourraient permettre le maintien d'un niveau d'activité des voies

de signalisation suffisant pour empêcher ou différer la survenue des altérations neurobiologiques responsables de la genèse des troubles mnésiques.

Dans la littérature, un ensemble de données cohérentes plaide en faveur d'une hypothèse selon laquelle des dérégulations, même faibles, du taux d'expression des récepteurs nucléaires pourraient se trouver à l'origine de nombreuses maladies comme le cancer, l'obésité ou les maladies neurodégénératives. C'est pourquoi il est admis aujourd'hui que ces récepteurs pourraient être des marqueurs moléculaires de certaines pathologies et qu'ils pourraient aussi représenter des cibles moléculaires de médicaments innovants ou de nutriments fonctionnels par exemple.





***REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES***



- A -

- Abu-Abed SS, Beckett BR, Chiba H, Chithalen JV, Jones G, Metzger D, Chambon P, Petkovich M. Mouse P450RAI (CYP26) expression and retinoic acid-inducible retinoic acid metabolism in F9 cells are regulated by retinoic acid receptor gamma and retinoid X receptor alpha. *J Biol Chem.* **1998.** 23, 273, 2409-15.
- 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.* **1994.** 27, 249-57.
- Andersen S, Bruun NH, Pedersen KM, Laurberg P. Biologic variation is important for interpretation of thyroid function tests. *Thyroid.* **2003.** 13, 1069-78.
- 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.* **2001.** 168, 250-58.
- 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.* **1992.** 31, 2774-78.
- Ashton AC, Dolly. JO. Microtubules and microfilaments participate in the inhibition of synaptosomal noradrenaline release by tetanus toxin. *J Neurochem.* **1997.** 68, 649-58.
- Aust O, Sies H, Stahl W, Polidori MC. Analysis of lipophilic antioxidants in human serum and tissues: tocopherols and carotenoids. *J Chromatogr A.* **2001.** 936, 83-93.
- 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.* **1995.** 65, 151-61.

- B -

- Baas D, Puymirat J, Sarlieve LL. Posttranscriptional regulation of oligodendroglial thyroid hormone (T3) receptor beta 1 by T3. *Int J Dev Neurosci.* **1998.** 16, 461-67.
- Baldelli P, Forni PE, Carbone E. BDNF, NT-3 and NGF induce distinct new Ca<sup>2+</sup> channel synthesis in developing hippocampal neurons. *Eur J Neurosci.* **2000.** 12, 4017-32.
- Ballow M, Wang X, Xiang S, Allen C. Expression and regulation of nuclear retinoic acid receptors in human lymphoid cells. *J Clin Immunol.* **2003.** 23, 46-54.
- Balmer JE, Blomhoff R. Gene expression regulation by retinoic acid. *J Lipid Res.* **2002.** 43, 1773-808.
- Bartres-Faz D, Junque C, Serra-Grabulosa JM, Lopez-Alomar A, Moya A, Bargallo N, Mercader JM, Moral P, Clemente IC. Dopamine DRD2 Taq I polymorphism associates with caudate nucleus volume and cognitive performance in memory impaired subjects. *Neuroreport.* **2002.** 13, 1121-25.
- Bartus RT. On neurodegenerative diseases, models, and treatment strategies: lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis. *Exp Neurol.* **2000.** 163, 495-529.
- Bassett JH, Harvey CB, Williams GR. Mechanisms of thyroid hormone receptor-specific nuclear and extra nuclear actions. *Mol Cell Endocrinol.* **2003.** 213, 1-11.
- Bastien J, Rochette-Egly C. **2004.** Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. *Gene.* 328, 1-16.

- Bauer M, Whybrow PC. Thyroid hormone, neural tissue and mood modulation. *World J Biol Psychiatry*. **2001**. 2, 59-69.
- Bavik C, Ward SJ, Chambon P. Developmental abnormalities in cultured mouse embryos deprived of retinoic by inhibition of yolk-sac retinol binding protein synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. **1996**. 93, 3110-14.
- 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*. **1997**. 221, 73-76.
- 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*. **1996**. 39, 193-99.
- Bedo G, Santisteban P, Aranda A. Retinoic acid regulates growth hormone gene expression. *Nature*. **1989**. 339, 231-34.
- Bellovino D, Apreda M, Gragnoli S, Massimi M, Gaetani S. Vitamin A transport: in vitro models for the study of RBP secretion. *Mol Aspects Med*. **2003**. 24, 411-20.
- Bendich A. From 1989 to 2001: what have we learned about the "biological actions of beta-carotene"? *J Nutr*. **2004**. 134, 225S-230S.
- Benowitz LI, Routtenberg A. GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity. *Trends Neurosci*. **1997**. 20, 84-91.
- Benvenga S, Lapa D, Trimarchi F. Re-evaluation of the thyroxine binding to human plasma lipoproteins using three techniques. *J Endocrinol Invest*. **2001**. 24, 16-8.
- Benvenga S, Alesci S, Trimarchi F. High-density lipoprotein-facilitated entry of thyroid hormones into cells: a mechanism different from the low-density lipoprotein-facilitated entry. *Thyroid*. **2002**. 12, 547-56.
- Berggren-Soderlund 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*. **2003**. 253, 375-80.
- Bernal J. Action of thyroid hormone in brain. *J Endocrinol Invest*. **2002**. 25, 268-88.
- Bernal J, Guadano-Ferraz A, Morte B. Perspectives in the study of thyroid hormone action on brain development and function. *Thyroid*. **2003**. 13, 1005-12.
- 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*. **1995**. 270, 22101-04.
- Bhat MK, Cama HR. Thyroidal control of hepatic release and metabolism of vitamin A. *Biochim Biophys Acta*. **1978**. 541, 211-22.
- Bianco AC, Salvatore D, Gereben B, Berry MJ, Larsen PR. Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocr Rev*. **2002**. 23, 38-89.
- Blaner WS. Retinoid (Vitamin A) metabolism and the liver. *The liver: Biol And Path*, 3<sup>rd</sup> edition, **1994**. 30, 529-41.
- 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*. **1993**. 632, 114-20.
- Bliss TV, Collingridge GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*. **1993**. 361, 31-39.

- Bocian-Sobkowska J, Wozniak W, Malendowicz LK. Morphometric studies on the development of the human thyroid gland. II. The late fetal life. *Histol Histopathol.* **1997.** 12, 79-84.
- Bogazzi F, Bartalena L, Brogioni S, Burelli A, Grasso L, Dell'Unto E, Manetti L, Martino E. L-thyroxine directly affects expression of thyroid hormone-sensitive genes: regulatory effect of RXRbeta. *Mol Cell Endocrinol.* **1997.** 134, 23-31.
- 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.* **1993.** 307, 85-90.
- Borel P, Mekki N, Boirie Y, Partier A, Alexandre-Gouabau MC, Grolier P, Beaufrere B, Portugal H, Lairon D, Azais-Braesco V. Comparison of the postprandial plasma vitamin A response in young and older adults. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* **1998.** 53, B133-40.
- Bourguet W, Ruff M, Bonnier D, Granger F, Boeglin M, Chambon P, Moras D, Gronemeyer H. Purification, functional characterization, and crystallization of the ligand binding domain of the retinoid X receptor. *Protein Expr Purif.* **1995.** 6, 604-608.
- 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.* **1989.** 86, 7250-4.
- Brandner C, Vantini G, Schenk F. Postnatal intracerebroventricular administrations of NGF alter spatial memory in adulthood. *Behav Brain Res.* **2000.** 111, 165-73.
- Braun AP, Schulman H. The multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase: from form to function. *Annu Rev Physiol.* **1995.** 57, 417-45.
- Breen JJ, Matsuura T, Ross AC, Gurr JA. Regulation of thyroid-stimulating hormone beta-subunit and growth hormone messenger ribonucleic acid levels in the rat: effect of vitamin A status. *Endocrinology.* **1995.** 136, 543-49.
- Breen JJ, Hickok NJ, Gurr JA. The rat TSHbeta gene contains distinct response elements for regulation by retinoids and thyroid hormone. *Mol Cell Endocrinol.* **1997.** 131, 137-46.
- Broedel O, Eravci M, Fuxius S, Smolarz T, Jeitner A, Grau H, Stoltenburg-Didinger G, Plueckhan H, Meinhold H, Baumgartner A. Effects of hyper- and hypothyroidism on thyroid hormone concentrations in regions of the rat brain. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **2003.** 285, E470-80.
- Brown NS, Smart A, Sharma V, Brinkmeier ML, Greenlee L, Camper SA, Jensen DR, Eckel RH, Krezel W, Chambon P, Haugen BR. Thyroid hormone resistance and increased metabolic rate in the RXR-gamma-deficient mouse. *J Clin Invest.* **2000.** 106, 73-79.
- Budhu AS, Noy N. Direct channeling of retinoic acid between cellular retinoic acid-binding protein II and retinoic acid receptor sensitizes mammary carcinoma cells to retinoic acid-induced growth arrest. *Mol Cell Biol.* **2002.** 22, 2632-41.
- Bugge TH, Pohl J, Lonnoy O, Stunnenberg HG. RXR alpha, a promiscuous partner of retinoic acid and thyroid hormone receptors. *EMBO J.* **1992.** 11, 1409-18.
- 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.* **1997.** 138, 5231-37.
- Burroughs V, Shenkman L. Thyroid function in the elderly. *Am J Med Sci.* **1982.** 283, 8-17.

- C -

- Calza L, Aloe L, Giardino L. Thyroid hormone-induced plasticity in the adult rat brain. *Brain Res Bull.* **1997.** 44, 549-57.
- Canaris GJ, Manowitz NR, Mayor G, Ridgway EC. The Colorado thyroid disease prevalence study. *Arch Intern Med.* **2000.** 160, 526-34.
- 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.* **2001.** 122, 1723-38.
- 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.* **2002.** 143, 2242-49.
- Chakraborti S, Chakraborti T, Mandal M, Das S, Batabyal SK. Hypothalamic-pituitary-thyroid axis status of humans during development of ageing process. *Clin Chim Acta.* **1999.** 288, 137-45.
- Chambaut-Guerin AM, Rouher C, Gauthereau X. p53 tumour necrosis factor receptors distribution in neuroblastoma cells. *Neuroreport.* **1997.** 8, 1451-56.
- Chambon P. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J.* **1996.** 10, 940-54.
- Chassande O, Fraichard A, Gauthier K, Flamant F, Legrand C, Savatier P, Laudet V, Samarut J. Identification of transcripts initiated from an internal promoter in the c-erbA alpha locus that encode inhibitors of retinoic acid receptor-alpha and triiodothyronine receptor activities. *Mol Endocrinol.* **1997.** 11, 1278-90.
- Chassande O. Do unliganded thyroid hormone receptors have physiological functions? *J Mol Endocrinol.* **2003.** 31, 9-20.
- 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.* **2000.** 28, 315-22.
- Chen J, Kelly PT. Retinoic acid stimulates alpha-CAMKII gene expression in PC12 cells at a distinct transcription initiation site. *J Neurosci.* **1996.** 16, 5704-14.
- Chen JD, Evans RM. A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature.* **1995.** 377, 454-57.
- Chen JS, Mehta K. Tissue transglutaminase: an enzyme with a split personality. *Int J Biochem Cell Biol.* **1999.** 31, 817-36.
- Chen M, Achkar C, Gudas LJ. Enzymatic conversion of retinaldehyde to retinoic acid by cloned murine cytosolic and mitochondrial aldehyde dehydrogenases. *Mol Pharmacol.* **1994.** 46, 88-96.
- Chen SJ, Sweatt JD, Klann E. Enhanced phosphorylation of the postsynaptic protein kinase C substrate RC3/neurogranin during long-term potentiation. *Brain Res.* **1997.** 749, 181-87.
- 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.* **2001.** 902, 272-76.
- 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.* **1994.** 72, 380-91.
- 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.* **1998.** 21, 1353-61.

- 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). **1997**. 1-15.
- 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*. **1989**. 39, 293-304.
- Chuo AM, Lim JK. Thyroid dysfunction in elderly patients. *Ann Acad Med Singapore*. **2003**. 32, 96-100.
- Chytil F, Haq R. Vitamin A mediated gene expression. *Crit Rev Euk Gene Expr*. **1990**. 1, 61-73.
- Citron BA, Suo Z, SantaCruz K, Davies PJ, Qin F, Festoff BW. Protein crosslinking, tissue transglutaminase, alternative splicing and neurodegeneration. *Neurochem Int*. **2002**. 40, 69-78.
- 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*. **2002**. 115, 475-82.
- Connor MJ, Sidell N. Retinoic acid synthesis in normal and Alzheimer diseased brain and human neural cells. *Mol Chem Neuropathol*. **1997** 30, 239-52.
- Constant EL, de Volder AG, Ivanoiu A, Bol A, Labar D, Seghers A, Cosnard G, Melin J, Daumerie C. Cerebral blood flow and glucose metabolism in hypothyroidism: a positron emission tomography study. *J Clin Endocrinol Metab*. **2001**, 86, 3864-70.
- Cook CB., Koenig RJ. Expression of erbA $\alpha$  and  $\beta$  mRNAs in regions of adult rat brain. *Mol and cell Endocrinol*. **1990**, 70, 13-20.
- Cooper DA. Carotenoids in health and disease: recent scientific evaluations, research recommendations and the consumer. *J Nutr*. **2004**. 134, 221S-224S.
- Coplan H.M., Sampson M.M. The effect of a deficiency of iodine and vitamin A on the thyroid gland of the albino rat. *J Nutr*. **1935**. 9, 275-88.
- Correa da Costa VM, Rosenthal D. Effect of aging on thyroidal and pituitary T4-5'-deiodinase activity in female rats. *Life Sci*. **1996**. 59, 1515-20.
- Coustaut M, Pallet V, Garcin H, Higuieret P. The influence of dietary vitamin A on triiodothyronine, retinoic acid, and glucocorticoid receptors in liver of hypothyroid rats. *Br J Nutr*. **1996**. 76, 295-306.
- Coya R, Carro E, Mallo F, Dieguez C. Retinoic acid inhibits in vivo thyroid-stimulating hormone secretion. *Life Sci*. **1997**. 60, 247-50.
- Crantz FR, Silva JE, Larsen PR. An analysis of the sources and quantity of 3,5,3'-triiodothyronine specifically bound to nuclear receptors in rat cerebral cortex and cerebellum. *Endocrinology*. **1982**. 110, 367-75.
- Croteau W, Whittemore SL, Schneider MJ, St Germain DL. Cloning and expression of a cDNA for a mammalian type III iodothyronine deiodinase. *J Biol Chem*. **1995**. 270, 16569-75.

- D -

- da Costa VM, Moreira DG, Rosenthal D. Thyroid function and aging: gender-related differences. *J Endocrinol*. **2001**. 171, 193-8.
- Dai G, Levy O, Carrasco N. Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter. *Nature*. **1996**. 379, 458-60.
- Dauncey MJ, White P, Burton KA, Katsumata M. Nutrition-hormone receptor-gene interactions: implications for development and disease. *Proc Nutr Soc*. **2001**. 60, 63-72.

- Davis PJ, Davis FB. Nongenomic actions of thyroid hormone. *Thyroid*. **1996**. 6, 497-504.
- Dawson HD, Yamamoto Y, Zolfaghari R, Rosales FJ, Dietz J, Shimada T, Li N, Ross AC. Regulation of hepatic vitamin A storage in a rat model of controlled vitamin A status during aging. *J Nutr*. **2000**. 130, 1280-86.
- De Luca LM. Retinoids and their receptors in differentiation, embryogenesis, and neoplasia. *FASEB J*. **1991**. 5, 2924-33.
- De Nayer P, Rennotte B, Caucheteux D. Thyroid hormone receptors in brain and liver during ageing. *Horm Metab Res*. **1991**. 23, 12-4.
- 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*. **1989**. 8, 429-33.
- Dev S, Adler AJ, Edwards RB. Adult rabbit brain synthesizes retinoic acid. *Brain Res*. **1993**. 632, 325-28.
- D'Hooge R, De Deyn PP. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res Brain Res Rev*. **2001**. 36, 60-90.
- Diez JJ. Hypothyroidism in patients older than 55 years: an analysis of the etiology and assessment of the effectiveness of therapy. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. **2002**. 57, M315-20.
- Diez JJ. Hyperthyroidism in patients older than 55 years: an analysis of the etiology and management. *Gerontology*. **2003**. 49, 316-23.
- Divino CM, Schussler GC. Receptor-mediated uptake and internalization of transthyretin. *J Biol Chem*. **1990**. 265, 1425-9.
- Dolle P, Fraulob V, Kastner P, Chambon P. Developmental expression of murine retinoid X receptor (RXR) genes. *Mech Dev*. **1994**. 45, 91-104.
- Dong D, Ruuska SE, Levinthal DJ, Noy N. Distinct roles for cellular retinoic acid-binding proteins I and II in regulating signaling by retinoic acid. *J Biol Chem*. **1999**. 274, 23695-98.
- Dratman MB, Gordon JT. Thyroid hormones as neurotransmitters. *Thyroid*. **1996**. 6, 639-47.
- Duarte J, Perriere G, Laudet V, Robinson-Rechavi M. NUREBASE: database of nuclear hormone receptors. *Nucleic Acids Res*. **2002**. 30, 364-68.
- Duester G, Shean ML, McBride MS, Stewart MJ. Retinoic acid response element in the human alcohol dehydrogenase gene ADH3: implications for regulation of retinoic acid synthesis. *Mol Cell Biol*. **1991**. 11, 1638-46.
- 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*. **1996**. 35, 12221-7.
- Duester G. Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function: production of visual pigment and retinoic acid. *Eur J Biochem*. **2000**. 267, 4315-24.
- 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*. **2003**. 1, 143-144:201-10.
- Dugbartey AT. Neurocognitive aspects of hypothyroidism. *Arch Intern Med*. **1998**. 158, 1413-18.
- Dugué M, Neugroshl J, Sewell M, Marin D. Review of dementia. *Mt Sinai J Med*. **2003**. 70, 45-53.
- Duntas LH. Thyroid disease and lipids. *Thyroid*. **2002**. 12, 287-93.



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*. **1996**. 12, 2443-50.

Dussault JH, Ruel J. Thyroid hormones and brain development. *Annu Rev Physiol*. **1987**. 49, 321-34.

- E -

Ekins R. Roles of serum thyroxine-binding proteins and maternal thyroid hormones in fetal development. *Lancet*. **1985**. 1, 1129-32.

Elmlinger MW, Dengler T, Weinstock C, Kuehnel W. Endocrine alterations in the aging male. *Clin Chem Lab Med*. **2003**. 41, 934-41.

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*. **2000**. 75, 991-1003.

Enderlin V., Pallet V., Alfos 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*. **1997a**. 229, 115-29.

Enderlin V, Alfos 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*. **1997b**. 412, 629-32.

Enderlin V, Higuieret D, Alfos S, Husson M, Jaffard R, Higuieret P, Pallet V. Vitamin A deficiency decreases the expression of RAR $\beta$  and RXR $\beta/\gamma$  in adult mouse brain: effect of retinoic acid administration. *Nutr Neurosci*. **2000**. 3, 173-81.

Enderlin V, Vallortigara J, Alfos S, Féart C, Pallet V, Higuieret P. Retinoic acid reverses the PTU-related decrease of its own receptors and neurogranin level in mice brain. Soumis à *J Physio Biochem*.

Enmark E, Gustafsson JA. Orphan nuclear receptors--the first eight years. *Mol Endocrinol*. **1996**. 10, 1293-1307.

Erfurth EM, Hagmar LE. Decreased serum testosterone and free triiodothyronine levels in healthy middle-aged men indicate an age effect at the pituitary level. *Eur J Endocrinol*. **1995**. 132, 663-67.

Erickson CA, Barnes CA. The neurobiology of memory changes in normal aging. *Exp Gerontol*. **2003**. 38, 61-69.

Esfandiari A, Gagelin C, Gavaret JM, Pavelka S, Lennon AM, Pierre M, Courtin F. Induction of type III-deiodinase activity in astroglial cells by retinoids. *Glia*. **1994**. 11, 255-61.

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*. **2001**. 21, 6423-29.

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*. **2003**. 145, 37-49.

- F -

- Farooqui SM Induction of adenylate cyclase sensitive dopamine D2-receptors in retinoic acid induced differentiated human neuroblastoma SHSY-5Y cells. *Life Sci.* **1994.** 55, 1887-93.
- Farwell AP, Safran M, Dubord S, Leonard JL. Degradation and recycling of the substrate-binding subunit of type II iodothyronine 5'-deiodinase in astrocytes. *J Biol Chem.* **1996.** 271, 16369-74.
- Fasano S, Brambilla R. Cellular mechanisms of striatum-dependent behavioral plasticity and drug addiction. *Curr Mol Med.* **2002.** 2, 649-65.
- 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.* **1995.** 7, 819-22.
- Finucane P, Anderson C. Thyroid disease in older patients. Diagnosis and treatment. *Drugs Aging.* **1995.** 6, 268-77.
- 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.* **2002.** 147, 371-79.
- Fisher DA, Nelson JC, Carlton EI, Wilcox RB. Maturation of human hypothalamic-pituitary-thyroid function and control. *Thyroid.* **2000.** 10, 229-34.
- Folk JE. Transglutaminase. *Annu Rev Biochem.* **1980.** 49, 517-31.
- Forette F, Rigaud AS, Le Divenah A, Seux-Le-Viel ML. Qu'est-ce que le vieillissement ? *Cah Nutr Diét.* **1996.** 31, 2, 81-87.
- Forman BM, Umesono K, Chen J, Evans RM. Unique response pathways are established by allosteric interactions among nuclear hormone receptors. *Cell.* **1995.** 81, 541-50.
- Freedman LP. Increasing the complexity of coactivation in nuclear receptor signaling. *Cell.* **1999.** 97, 5-8.
- 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.* **1991.** 43, 331-34.
- Fujii H, Sato T, Kaneko S, Gotoh O, Fujii-Kuriyama Y, Osawa K, Kato S, Hamada H. Metabolic inactivation of retinoic acid by a novel P450 differentially expressed in developing mouse embryos. *EMBO J.* **1997.** 16, 4163-73.
- Fukui T, Hasegawa Y, Takenaka H. Hyperthyroid dementia: clinicoradiological findings and response to treatment. *J Neurol Sci.* **2001.**, 184, 81-88.
- Fuller PJ. The steroid receptor family: mechanism of diversity. *FASEB J.* **1991.** 5, 3092-99.
- Furr HC. Analysis of retinoids and carotenoids: problems resolved and unsolved. *J Nutr.* **2004.** 134, 281S-285S.

- G -

- 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.* **1992.** 52, 4402-07.
- 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.* **1993.** 196, 396-401.

- Garcin H, Higuieret P. Influence of vitamin A deficiency on thyroxinemia in the rat. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D*. **1977**. 285, 531-33.
- Garcin H, Higuieret P. Free and protein-bound tri-iodothyronine in the serum of vitamin A-deficient rats. *J Endocrinol*. **1980**. 84, 135-40.
- Garcin H, Higuieret P. Thyroid hormones in vitamin A-deficient rats: effect of retinoic acid supplementation. *Ann Nutr Métab*. **1983**. 27, 495-500.
- Garcin H, Higuieret P, Amoikon K. Effects of a large dose of retinol or retinoic acid on the thyroid hormones in the rat. *Ann Nutr Metab*. **1984**. 28, 92-100.
- Garel S, Marin F, Grosschedl R, Charnay P. Ebf1 controls early cell differentiation in the embryonic striatum. *Development*. **1999**. 126, 5285-94.
- Gauthier K, Chassande O, Plateroti M, Roux JP, Legrand C, Pain B, Rousset B, Weiss R, Trouillas J, Samarut J Different functions for the thyroid hormone receptors TRalpha and TRbeta in the control of thyroid hormone production and post-natal development. *EMBO J*. **1999**. 18, 623-31.
- Gavaret JM, Cahnmann HJ, Nunez J. Thyroid hormone synthesis in thyroglobulin. The mechanism of the coupling reaction. *J Biol Chem*. **1981**. 256, 9167-73.
- Gavrilov LA, Gavrilova NS. The reliability theory of aging and longevity. *J Theor Biol*. **2001**. 213, 527-45.
- Gazzaley A, Kay S, Benson DL. Dendritic spine plasticity in hippocampus. *Neurosciences*. **2002**. 111, 853-62.
- Gerendasy DD., and Sutcliffe JG. RC3/ Neurogranine, a post-synaptic calpacitin for setting the reponse threshold to calcium influxes. *Mol Neurobiol*. **1997**. 15, 131-63.
- 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*. **2001**. 922, 250-60.
- Ghyselinck NB, Bavik C, Sapin V, Mark M, Bonnier D, Hindelang C, Dierich A, Nilsson CB, Hakansson H, Sauvart P, Azais-Braesco V, Frasson M, Picaud S, Chambon P. Cellular retinol-binding protein I is essential for vitamin A homeostasis. *EMBO J*. **1999**. 18, 4903-14.
- 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*. **1995**. 687, 83-93.
- Giguere V, Ong ES, Segui P, Evans RM. Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid. *Nature*. **1987**. 330, 624-29.
- Giguere V. Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins: complex interplay in retinoid signaling. *Endocr Rev*. **1994**. 15, 61-79.
- Giguere V. Les récepteurs nucléaires orphelins: régulateurs essentiels du développement, de l'organogénèse et de l'homéostasie. *Méd Sci*. **1997**. 13, 459-66.
- Glass CK, Franco R, Weinberger C, Albert VR, Evans RM, Rosenfeld MG. A c-erb-A binding site in rat growth hormone gene mediates trans-activation by thyroid hormone. *Nature*. **1987**. 329, 738-41.
- Glass CK. Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers and heterodimers. *Endocrin Rev*. **1994**. 15, 391-407.
- Glass CK, Rosenfeld MG. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev*. **2000**. 14, 121-41.
- Gomes FC, Paulin D, Moura Neto V. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): modulation by growth factors and its implication in astrocyte differentiation. *Braz J Med Biol Res*. **1999**. 32, 619-31.

- Goodman AB, Pardee AB. Evidence for defective retinoid transport and function in late onset Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2003**. 100, 2901-05.
- Goswami UC, Choudhury S. The status of retinoids in women suffering from hyper- and hypothyroidism: interrelationship between vitamin A, beta-carotene and thyroid hormones. *Int J Vitam Nutr Res*. **1999**. 69, 132-35.
- Gould E, Allan MD, McEwen BS. Dendritic spine density of adult hippocampal pyramidal cells is sensitive to thyroid hormone. *Brain Res*. **1990**. 525, 327-29.
- 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*. **1986**. 320, 134-39.
- Grummer MA, Zachman RD. Interaction of ethanol with retinol and retinoic acid in RAR beta and GAP-43 expression. *Neurotoxicol Teratol*. **2000**. 22, 829-36.
- 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*. **1997**. 49, 37-44.
- Guadaño-Ferraz A, Benavides-Piccione R, Venero C, Lancha C, Vennstrom B, Sandi C, DeFelipe J, Bernal J. Lack of thyroid hormone receptor alpha1 is associated with selective alterations in behavior and hippocampal circuits. *Mol Psychiatry*. **2003**. 8, 30-38.
- Gullberg H, Rudling M, Forrest D, Angelin B, Vennstrom B. Thyroid hormone receptor beta-deficient mice show complete loss of the normal cholesterol 7alpha-hydroxylase (CYP7A) response to thyroid hormone but display enhanced resistance to dietary cholesterol. *Mol Endocrinol*. **2000**. 14, 1739-49.
- H -**
- Haller J, Weggemans RM, Lammi-Keefe CJ, Ferry M Changes in the vitamin status of elderly Europeans: plasma vitamins A, E, B-6, B-12, folic acid and carotenoids. SENECA Investigators. *Eur J Clin Nutr*. **1996**. 50 (Suppl 2), S32-46.
- Hänninen T, Hallikainen M, Tuomainen S, Vanhanen M, Soininen H. Prevalence of mild cognitive impairment: a population-based study in elderly subjects. *Acta Neurol Scand*. **2002**. 106, 148-54.
- Haq R, Pfahl M, Chytil F. Retinoic acid affects the expression of nuclear retinoic acid receptors in tissues of retinol-deficient rats. *Proc Natl Acad Sci USA*. **1991**. 88, 8272-76.
- Harding HP, Lazar MA. The monomer-binding orphan receptor Rev-Erb represses transcription as a dimmer on a novel direct repeat. *Mol Cell Biol*. **1995**. 15, 4791-802.
- Harding PP, Duyster G. Retinoic acid activation and thyroid hormone repression of the human alcohol dehydrogenase gene ADH3. *J Biol Chem*. **1992**. 267, 14145-50.
- Harrison EH, Hussain MM. Mechanisms involved in the intestinal digestion and absorption of dietary vitamin A. *J Nutr*. **2001**. 131, 1405-8.
- Harvey CB, Williams GR. Mechanism of thyroid hormone action. *Thyroid*. **2002**. 12, 441-6.
- Hashimoto K, Curty FH, Borges PP, Lee CE, Abel ED, Elmquist JK, Cohen RN, Wondisford FE. An unliganded thyroid hormone receptor causes severe neurological dysfunction. *Proc Natl Acad Sci USA*. **2001**. 98, 3998-4003.
- Heicklen-Klein A, Aronov S, Ginzburg I. Tau promoter activity in neuronally differentiated P19 cells. *Brain Res*. **2000**. 874, 1-9.

- 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.* **2001.** 22, 451-76.
- 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.* **1992.** 68, 397-406.
- Higueret P, Garcin H. Transport of thyroxine in the serum of vitamin A-deficient rats. *J Endocrinol.* **1979.** 80, 223-8.
- Higueret P, Garcin H. Peripheral metabolism of thyroid hormones in vitamin A-deficient rats. *Ann Nutr Metab.* **1982.** 26, 191-200.
- Higueret P, Garcin H. Triiodothyronine and vitamin A-deficiency in the rat. *J Physiol (Paris).* **1984.** 79, 373-77.
- Higueret P, Pailler I, Garcin H. Vitamin A deficiency and tri-iodothyronine action at the cellular level in the rat. *J Endocrinol.* **1989.** 121, 75-79.
- Higueret P, Pallet V, Coustaut M, Audouin I, Begueret J, Garcin H. Retinoic acid decreases retinoic acid and triiodothyronine nuclear receptor expression in the liver of hyperthyroidic rats. *FEBS Lett.* **1992.** 310, 101-05,.
- Hirst MA, Hinck L, Danielsen M, Ringold GM. Discrimination of DNA response elements for thyroid hormone and estrogen is dependent on dimerization of receptor DNA binding domains. *Proc Natl Acad Sci USA.* **1992.** 89, 5527-31.
- 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.* **1989.** 7, 76-9.
- Hodin RA, Lazar MA, Chin WW. Differential and tissue-specific regulation of the multiple rat c-erbA messenger RNA species by thyroid hormone. *J Clin Invest.* **1990.** 85, 101-5.
- Hollander D, Dadufalza V. Influence of aging on vitamin A transport into the lymphatic circulation. *Exp Gerontol.* **1990.** 25, 61-65.
- 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.* **1985.** 318, 635-41.
- Hollowell JG, Staehling NW, Flanders WD, Hannon WH, Gunter EW, Spencer CA, Braverman LE. Serum TSH, T(4), and thyroid antibodies in the United States population (1988 to 1994): National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *J Clin Endocrinol Metab.* **2002.** 87, 489-99.
- 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.* **2002.** 15, 1976-82.
- Husson M, Enderlin V, Alfos S, Feart C, Higueret 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.* **2003.** 90, 191-8.
- Husson M, Ederlin V, Alfos S, Boucheron C, Pallet V, Higueret P. Expression of neurogranin and neuromodulin is affected in the striatum of vitamin A deprived rats. *Mol. Brain Res,* **2004.** 123, 7-17.

- I -

- Idres N, Marill J, Flexor MA, Chabot GG. Activation of retinoic acid receptor-dependent transcription by all-trans-retinoic acid metabolites and isomers. *J Biol Chem.* **2002.** 277, 31491-98.
- 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.* **2002.** 16, 145-48.
- Ingenbleek Y, De Visscher M. Hormonal and nutritional status: critical conditions for endemic goiter epidemiology? *Metabolism.* **1979.** 28, 9-19.
- Ingenbleek Y, Luypaert B, De Nayer P. Nutritional status and endemic goitre. *Lancet.* **1980.** 23;1, 388-91.
- Ingenbleek Y. Vitamin A-deficiency impairs the normal mannosylation, conformation and iodination of thyroglobulin: a new etiological approach to endemic goitre. *Experientia.* **1983.** 44, 264-97.
- Iñiguez MA, Rodriguez-Peña A, Ibarrola N, Morreale de Escobar G, Bernal J. Adult rat brain is sensitive to thyroid hormone. Regulation of RC3/neurogranin mRNA. *J Clin Invest.* **1992.** 90, 554-58.
- 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.* **1993.** 133, 467-73.
- 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.* **1994.** 27, 205-14.
- Iñiguez MA, De Lecea L, Guadaño-Ferraz A, Morte B, Gerendasy D, Sutcliffe JG, Bernal J. Cell-specific effects of thyroid hormone on RC3/neurogranin expression in rat brain. *Endocrinology.* **1996.** 137, 1032-41.
- 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.* **1990.** 4, 837-44.
- Izumo S, Mahdavi V. Thyroid hormone receptor alpha isoforms generated by alternative splicing differentially activate myosin HC gene transcription. *Nature.* **1988.** 334, 539-42.

- J -

- Jaeschke R, Guyatt G, Gerstein H, Patterson C, Molloy W, Cook D, Harper S, Griffith L, Carbotte R. Does treatment with L-thyroxine influence health status in middle-aged and older adults with subclinical hypothyroidism? *J Gen Intern Med.* **1996.** 11, 744-49.
- Jansen-Dürr P, Osiewacz HD. Healthy ageing: a question of stress, damage and repair. Meeting on mechanisms of biological ageing. *EMBO Rep.* **2002.** 3, 1127-32.
- Jeannin E, Robyr D, Desvergne B. Transcriptional regulatory patterns of the myelin basic protein and malic enzyme genes by the thyroid hormone receptors alpha1 and beta1. *J Biol Chem.* **1998.** 273, 24239-48.
- Jones KE, Yaffe BM, Chin WW. Regulation of thyroid hormone receptor beta-2 mRNA levels by retinoic acid. *Mol Cell Endocrinol.* **1993.** 91, 113-18.
- Juge-Aubry CE, Morin O, Pernin AT, Liang H, Philippe J, Burger AG. Long-lasting effects of Triac and thyroxine on the control of thyrotropin and hepatic deiodinase type I. *Eur J Endocrinol.* **1995.** 132, 751-58.

- K -

- Kalmijn S, Mehta KM, Pols HA, Hofman A, Drexhage HA, Breteler MM. Subclinical hyperthyroidism and the risk of dementia. The Rotterdam study. *Clin Endocrinol (Oxf)*. **2000**. 53, 733-7.
- Kandel ER, Pittenger C. The past, the future and the biology of memory storage. *Philos T Roy Soc Lond B Biol Sci*. **1999**. 354, 2027-52.
- 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*. **1992**. 286, 755-60.
- 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*. **1996**. 10, 119-31.
- Kim SN, Kim SG, Park SD, Cho-Chung YS, Hong SH. Participation of type II protein kinase A in the retinoic acid-induced growth inhibition of SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *J Cell Physiol*. **2000**. 182, 421-28.
- Kim SY, Jeitner TM, Steinert PM. Transglutaminases in disease. *Neurochem Int*. **2002**. 40, 85-103.
- Klein ES, Wang JW, Khalifa B, Gavigan SA, Chandraratna RA. Recruitment of nuclear receptor corepressor and coactivator to the retinoic acid receptor by retinoid ligands. Influence of DNA-heterodimer interactions. *J Biol Chem*. **2000**. 275, 19401-08.
- Kliwer SA, Umesono K, Mangelsdorf DJ, Evans RM. Retinoid X receptor interacts with nuclear receptors in retinoic acid, thyroid hormone and vitamin D3 signalling. *Nature*. **1992**. 355, 446-49.
- Knudsen N, Laurberg P, Perrild H, Bulow I, Ovesen L, Jorgensen T. Risk factors for goiter and thyroid nodules. *Thyroid*. **2002**. 12, 879-88.
- 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*. **1994**. 337, 259-64.
- Koenig RJ, Warne RL, Brent GA, Harney JW, Larsen PR, Moore DD. Isolation of a cDNA clone encoding a biologically active thyroid hormone receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1988**. 85, 5031-5.
- 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*. **1989**. 337, 659-61.
- Kohrle J. The deiodinase family: selenoenzymes regulating thyroid hormone availability and action. *Cell Mol Life Sci*. **2000**. 57, 1853-63.
- 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*. **2002**. 99, 1253-58.
- 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*. **1987**. 84, 7329-33.
- König S, Moura Neto V. Thyroid hormone actions on neural cells. *Cell Mol Neurobiol*. **2002**. 22, 517-44.
- Koob GF. Alcoholism: Allostasis and beyond. *Alcohol Clin Exp Res*. **2003**. 27, 232-43.
- Krezel W, Kastner P, Chambon P. Differential expression of retinoid receptors in the adult mouse central nervous system. *Neuroscience*. **1999**. 89, 1291-1300.

Kurlandsky SB, Gamble MV, Ramakrishnan R, Blaner WS. Plasma delivery of retinoic acid to tissues in the rat. *J Biol Chem.* **1995.** 270, 17850-57.

Kvetny J. Nuclear thyroxine and triiodothyronine binding in mononuclear cells in dependence of age. *Horm Metab Res.* **1985.** 17, 35-8.

Kvetny J, Wandrup J. Nuclear thyroxine binding in human mononuclear blood cells from hyperthyroid and hypothyroid patients before and after treatment. *Scand J Clin Lab Invest.* **1986.** 46, 489-93.

- L -

Laflamme L, Hamann G, Messier N, Maltais S, M-F Langlois. RXR acts as a coregulator in the regulation of genes of the hypothalamo-pituitary axis by thyroid hormone receptors. *J Mol Endocrinol.* **2002.** 29, 61-72.

Larsen PR, Berry MJ. Nutritional and hormonal regulation of thyroid hormone deiodinases. *Annu Rev Nutr.* **1995.** 15, 323-52.

Laudet V, Vanacker JM. Les récepteurs nucléaires d'hormones en folie! *Méd Sci.* **1999.** 15, 225-29.

Lazar MA, Hodin RA, Darling DS, Chin WW. A novel member of the thyroid/steroid hormone receptor family is encoded by the opposite strand of the rat c-erbA alpha transcriptional unit. *Mol Cell Biol.* **1989.** 9, 1128-36.

Lazar MA. Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities. *Endocr Rev.* **1993.** 14, 184-93.

Lazar MA. Thyroid hormone action: a binding contract. *J Clin Invest.* **2003.** 112, 497-99.

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.* **1993.** 9, 105-12.

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.* **2000.** 28, 205-08.

Lee JW, Ryan F, Swaffield JC, Johnston SA, Moore DD. Interaction of thyroid-hormone receptor with a conserved transcriptional mediator. *Nature.* **1995.** 374, 91-94.

Legrand J. Effects of thyroid hormones on central nervous system. Ed *Neurobehavioural Teratology.* **1984.** 331-363.

Leitman DC, Costa CH, Graf H, Baxter JD, Ribeiro RC. Thyroid hormone activation of transcription is potentiated by activators of cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem.* **1996.** 271, 21950-5.

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.* **1995.** 168, 514-28.

Lesort M, Tucholski J, Miller ML, Johnson GV. Tissue transglutaminase: a possible role in neurodegenerative diseases. *Prog Neurobiol.* **2000.** 61, 439-63.

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.* **1992.** 355, 359-61.

Levy EG. Thyroid disease in the elderly. *Med Clin North Am.* **1991.** 75, 151-67.

Li D, Li T, Wang F, Tian H, Samuels HH. Functional evidence for retinoid X receptor (RXR) as a nonsilent partner in the thyroid hormone receptor/RXR heterodimer. *Mol Cell Biol.* **2002.** 22, 5782-92.



- Li DQ, Kuang AK, Ding T, Chen JL, Xu MY. Nuclear 3,5,3'-triiodothyronine receptors (T3R) of circulating human lymphocytes in hyper- and hypothyroidism and nonthyroidal diseases. *Chin Med J (Engl)*. **1990**. 103, 355-8.
- Li E, Tso P. Vitamin A uptake from foods. *Curr Opin Lipidol*. **2003**. 14, 241-7.
- Lindeboom J, Weinstein H. Neuropsychology of cognitive ageing, minimal cognitive impairment, Alzheimer's disease, and vascular cognitive impairment. *Eur J Pharmacol*. **2004**. 490, 83-6.
- Lindholm D, Castren E, Tsoulfas P, Kolbeck R, Berzaghi Mda P, Leingartner A, Heisenberg CP, Tessarollo L, Parada LF, et AL, et al. Neurotrophin-3 induced by tri-iodothyronine in cerebellar granule cells promotes Purkinje cell differentiation. *J Cell Biol*. **1993**. 122, 443-50.
- 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*. **1994**. 120, 2723-48.
- Lopez-Carballo G, Moreno L, Masia S, Perez P, Baretino D. Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway by retinoic acid is required for neural differentiation of SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *J Biol Chem*. **2002**. 277, 25297-304.

- M -

- 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*. **2002**. 283, E326-E331.
- Maden M, Hind M. Retinoic acid, a regeneration-inducing molecule. *Dev Dynam*. **2003**. 226, 237-44.
- 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*. **2001**. 56, 173-82.
- 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*. **2002**. 51, 105-9.
- Makowski A, Brzostek S, Cohen RN, Hollenberg AN. Determination of nuclear receptor corepressor interactions with the thyroid hormone receptor. *Mol Endocrinol*. **2003**. 17, 273-86.
- Malenka RC. Synaptic plasticity in the hippocampus: LTP and LTD. *Cell*. **1994**. 78, 535-38.
- Malenka RC, Nicoll RA. Long-term potentiation--a decade of progress? *Science*. **1999**. 285, 1870-74.
- Malik MA, Blusztajn JK, Greenwood CE. Nutrients as trophic factors in neurons and the central nervous system: role of retinoic acid. *J Nutr Biochem*. **2000**. 11, 2-13.
- Manciet G, Dartigues JF, Decamps A, Barberger-Gateau P, Letenneur L, Latapie MJ, Latapie JL. The PAQUID survey and correlates of subclinical hypothyroidism in elderly community residents in the southwest of France. *Age Ageing*. **1995**. 24, 235-41.
- Mandel SJ, Berry MJ, Kieffer JD, Harney JW, Warne RL, Larsen PR. Cloning and in vitro expression of the human selenoprotein, type I iodothyronine deiodinase. *J Clin Endocrinol Metab*. **1992**. 75, 1133-39.
- Mangelsdorf DJ. Vitamin A receptors. *Nutr Rev*. **1994**. 52, S32-44.
- Mangelsdorf DJ, Evans RM. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell*. **1995**. 83, 841-50.

- Mani S, Schaefer J, Meiri KF. Targeted disruption of GAP-43 in P19 embryonal carcinoma cells inhibits neuronal differentiation. As well as acquisition of the morphological phenotype. *Brain Res.* **2000.** 853, 384-95.
- 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.* **1993.** 191, 943-49.
- Margarity M, Valcana T, Timiras PS. Thyroxine deiodination, cytoplasmic distribution and nuclear binding of thyroxine and triiodothyronine in liver and brain of young and aged rats. *Mech Ageing Dev.* **1985.** 29, 181-89.
- Marighetto A, Touzani K, Etchamendy N, Torrea CC, De Nanteuil G, Guez D, Jaffard R, Morain P. Further evidence for a dissociation between different forms of mnemonic expressions in a mouse model of age-related cognitive decline: effects of tacrine and S 17092, a novel prolyl endopeptidase inhibitor. *Learn Mem.* **2000.** 7, 159-69.
- Marill J, Idres N, Capron CC, Nguyen E, Chabot GG. Retinoic acid metabolism and mechanism of action: a review. *Curr Drug Meta.* **2003.** 4, 1-10.
- Mariotti S, Chiovato L, Franceschi C, Pinchera A. Thyroid autoimmunity and aging. *Exp Gerontol.* **1998.** 33, 535-41.
- Martel J, Cayrou C, Puymirat J. Identification of new thyroid hormone-regulated genes in rat brain neuronal cultures. *Neuroreport.* **2002.** 13, 1849-51.
- Martin A. Les apports nutritionnels conseillés pour la population française. *Traité de Nutrition Clinique de l'Adulte*, Flammarion Médecine-Sciences, Paris, **2001.**
- 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.* **2001.** 268, 5045-56.
- 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.* **1999.** 140, 335-43.
- Marty R. Gènes, environnement et vieillesse. *Reproduction humaine et hormones.* **1996.** 9, 71-80.
- Mason GA, Walker CH, Prange AJ Jr. L-triiodothyronine: is this peripheral hormone a central neurotransmitter? *Neuropsychopharmacology.* **1993.** 8, 253-8.
- 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.* **1994.** 91, 7772-76.
- McCaffery P, Dräger UC. Retinoic acid synthesizing enzymes in the embryonic and adult vertebrate. *Adv Exp Med Biol.* **1995.** 372 173-83..
- McCaffery PJ, Adams J, Maden M, Rosa-Molinar E. Too much of a good thing: retinoic acid as an endogenous regulator of neural differentiation and exogenous teratogen. *Eur J Neurosci.* **2003.** 18, 457-72.
- McEwen BS, Wingfield JC. The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Horm Behav.* **2003,** 43, 2-15.
- McKenna NJ, O'Malley BW. Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell.* **2002.** 108, 465-74.
- McLaren DS, Mawlayi Z, Downing A. Distribution of vitamin A in human liver. *Proc Nutr Soc.* **1979.** 38, 49A.

- Mecocci P, Polidori MC, Troiano L, Cherubini A, Cecchetti R, Pini G, Straatman M, Monti D, Stahl W, Sies H, Franceschi C, Senin U. Plasma antioxidants and longevity: a study on healthy centenarians. *Free Radic Biol Med.* **2000.** 28, 1243-48.
- 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.* **1995.** 18, 767-73.
- 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.* **1994.** 120, 2749-71.
- Meunier JM, Shvaloff A. *Neurotransmetteurs.* Abrégés Masson, 2<sup>ème</sup> éd, **1995.**
- Mesaros-Kanjiski E, Kontosic I, Kusic Z, Kaic-Rak A, Dakovic N, Kuser J, Antonic K. Endemic goitre and plasmatic levels of vitamins A and E in the school-children on the island of Krk, Croatia. *Coll Antropol.* **1999.** 23, 729-36.
- Mey J, Rombach N. Retinoic acid increases BDNF-dependent regeneration of chick retinal ganglion cells in vitro. *Neuroreport.* **1999.** 10, 3573-77.
- 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.* **1986.** 68, 389-99.
- Mignotte V. Les doigts de zinc (2): les récepteurs hormonaux nucléaires. *Hématologie.* **1997.** 4, 351-53.
- Mino M, Tamai H, Tanabe T, Morinobu T, Ohsawa N, Takamatsu J, Miyata S, Hirahara F. Nutritional status of antioxidant vitamins (A, E, and beta-carotene) in elderly Japanese. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* **1993.** 39 Suppl:S67-74.
- Mitchell GE, Little CO, Hayes BW. Influence of thyroid activity on carotene disappearance from the rat intestine. *Life Sci.* **1966.** 5, 277-82.
- Mitsuhashi T, Tennyson GE, Nikodem VM. Alternative splicing generates messages encoding rat c-erbA proteins that do not bind thyroid hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1988.** 85, 5804-8.
- Miyajima N, Horiuchi R, Shibuya Y, Fukushige S, Matsubara K, Toyoshima K, Yamamoto T. Two erbA homologs encoding proteins with different T3 binding capacities are transcribed from opposite DNA strands of the same genetic locus. *Cell.* **1989.** 57, 31-9.
- Miyoshi E, Wietzikoski S, Camplessei M, Silveira R, Takahashi RN, Da Cunha C. Impaired learning in a spatial working memory version and in a cued version of the water maze in rats with MPTP-induced mesencephalic dopaminergic lesions. *Brain Res Bull.* **2002.** 58, 41-77.
- Mizukami Y, Michigishi T, Nonomura A, Hashimoto T, Terahata S, Noguchi M, Hisada K, Matsubara F. Distant metastases in differentiated thyroid carcinomas: a clinical and pathologic study. *Hum Pathol.* **1990.** 21, 283-90.
- 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.* **1991.** 121, 510-17.
- Mohandas R, Gupta KL. Managing thyroid dysfunction in the elderly. Answers to seven common questions. *Postgrad Med.* **2003.** 113, 54-6, 65-8, 100.
- Mollard R, Viville S, Ward SJ, Decimo D, Chambon P, Dolle P. Tissue-specific expression of retinoic acid receptor isoform transcripts in the mouse embryo. *Mech Dev.* **2000.** 94, 223-32.
- 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.* **2001.** 79, 859-67.

- Montero-Pedrazuela A, Bernal J, Guadaño-Ferraz A. Divergent expression of type 2 deiodinase and the putative thyroxine-binding protein p29, in rat brain, suggests that they are functionally unrelated proteins. *Endocrinology*. **2003**. 144, 1045-52.
- 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*. **1996**. 46, 107-12.
- Mooradian AD. Mechanisms of age-related endocrine alterations. Part I. *Drugs Aging*. **1993a**. 381-97.
- Mooradian AD. Mechanisms of age-related endocrine alterations. Part II. *Drugs Aging*. **1993b**. 3, 131-46.
- Moreno S, Farioli-Vecchioli S, Ceru MP. Immunolocalization of peroxisome proliferator-activated receptors and retinoid X receptors in the adult rat CNS. *Neuroscience*. **2004**. 123, 131-45.
- Morley JE, Melmed S, Reed A, Kasson BG, Levin SR, Pekary AE, Hershman JM. Effect of vitamin A on the hypothalamo-pituitary-thyroid axis. *Am J Physiol*. **1980**. 238, E174-9.
- Morrison JH, Hof PR. Life and death of neurons in the aging brain. *Science*. **1997**. 278, 412-19.
- Moser MB. Making more synapses: a way to store information? *Cell Mol Life Sci*. **1999**. 69, 902-09
- Mukhopadhyay D, Plateroti M, Anant S, Nassir F, Samarut J, Davidson NO. Thyroid hormone regulates hepatic triglyceride mobilization and apolipoprotein B messenger ribonucleic Acid editing in a murine model of congenital hypothyroidism. *Endocrinology*. **2003**. 144, 711-19.
- Muñoz A, Rodríguez-Peña A, Perez-Castillo A, Ferreiro B, Sutcliffe JG, Bernal J. Effects of neonatal hypothyroidism on rat brain gene expression. *Mol Endocrinol*. **1991**. 5, 273-80.
- Murray M, Sefton RM, Croft KD, Butler AM. Differential regulation of endobiotic-oxidizing cytochromes P450 in vitamin A-deficient male rat liver. *Br J Pharmacol*. **2001**. 134, 1487-97.

- N -

- Namba H, Yamashita S, Morita S, Villadolid MC, Kimura H, Yokoyama N, Izumi M, Ishikawa N, Ito K, Nagataki S. Retinoic acid inhibits human thyroid peroxidase and thyroglobulin gene expression in cultured human thyrocytes. *J Endocrinol Invest*. **1993**. 16, 87-93.
- Nagayama Y, Yamashita S, Hirayu H, Ashizawa K, Harakawa S, Inoue S, Izumi M, Nagataki S. Expression and regulation of c-erb-A mRNA from lymphocytes in patients with thyroid dysfunction. *Endocrinol Jpn*. **1988**. 35, 463-7.
- Nagpal S, Saunders M, Kastner P, Durand B, Nakshatri H, Chambon P. Promoter context-and response element-dependent specificity of the transcriptional activation and modulating functions of retinoic acid receptors. *Cell*. **1992**. 70, 1007-19.
- Nagpal S, Chandraratna RA. Vitamin A and regulation of gene expression. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. **1998**. 1, 341-6.
- 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*. **1996**. 271, 435-40.
- Napoli JL. Retinoic acid biosynthesis and metabolism. *FASEB*. **1996**. 10, 993-1001.
- Napoli JL. Retinoic acid: its biosynthesis and metabolism. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. **1999**. 63, 139-88.
- Noy N. Retinoid-binding proteins: mediators of retinoid action. *Biochem J*. **2000**. 348, 481-495.

Nuclear Receptor Committee. A unified Nomenclature System for the Nuclear Receptor Subfamily. *Cell*. **1999**. 97, 161-63.

- O -

Obregon MJ, Morreale de Escobar G, Escobar del Rey F. Concentrations of triiodo-L-thyronine in the plasma and tissues of normal rats, as determined by radioimmunoassay: comparison with results obtained by an isotopic equilibrium technique. *Endocrinology*. **1978**. 103, 2145-53.

O'Donnell AL, Koening RJ. Mutational analysis identifies a new functional domain of the thyroid hormone receptor. *Mol Endocrinol*. **1990**. 4, 715-20.

O'Mallet BW. *Mol Endocrinol*. **1990**, 4. 363-369.

Okuma Y, Murayama T, Tha KK, Yamada C, Hosokawa M, Ishikawa A, Watanabe R, Maekawa M, Nomura Y. Learning deficiency and alterations in acetylcholine receptors and protein kinase C in the brain of senescence-accelerated mouse (SAM)-P10. *Mech Ageing Dev*. **2000**. 114, 191-99.

Okuno M, Caraveo VE, Goodman DS, Blaner WS. Regulation of adipocyte gene expression by retinoic acid and hormones: effects on the gene encoding cellular retinol-binding protein. *J Lipid Res*. **1995**. 36, 137-47.

Oppenheimer JH, Schwartz HL, Surks MI. Propylthiouracil inhibits the conversion of L-thyroxine to L-triiodothyronine. An explanation of the antithyroxine effect of propylthiouracil and evidence supporting the concept that triiodothyronine is the active thyroid hormone. *J Clin Invest*. **1972**. 51, 2493-97.

Oppenheimer JH. Evolving concepts of thyroid hormone action. *Biochimie*. **1999**. 81, 539-43.

Osothimehin B, Awotedu AA. Serum thyroxine, triiodothyronine, reverse triiodothyronine, thyroid stimulating hormone, thyroxine binding globulin and thyroxine binding pre-albumin concentrations in healthy African adults. *Trop Geogr Med*. **1981**. 33, 281-86.

- P -

Packard MG, Knowlton BJ. Learning and memory functions of the Basal Ganglia. *Annu Rev Neurosci*. **2002**. 25, 563-93.

Paik J, Vogel S, Quadro L, Piantedosi R, Gottesman M, Lai K, Hamberger L, Vieira Mde M, Blaner WS. Vitamin A: overlapping delivery pathways to tissues from the circulation. *J Nutr*. **2004**. 134, 276S-280S.

Pailler-Rodde I, Garcin H, Higuieret P, Begueret J. c-erb-A mRNA content and triiodothyronine nuclear receptor binding capacity in rat liver according to vitamin A status. *FEBS Lett*. **1991**. 289, 33-36.

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*. **2000**. 97, 11232-37.

Pallet V, Audouin-Chevallier I, Verret C, Garcin H, Higuieret P. Retinoic acid differentially modulates triiodothyronine and retinoic acid receptors in rat liver according to thyroid status. *Eur J Endocrinol*. **1994**. 131, 377-84.

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*. **1997**. 99, 123-36.

- Pallud S, Ramage M, Gavaret JM, Lennon AM, Munsch N, St Germain DL, Pierre M, Courtin F. Regulation of type 3 iodothyronine deiodinase expression in cultured rat astrocytes: role of the Erk cascade. *Endocrinology*. **1999**. 140, 2917-23.
- Paradies MA, Steward O. Multiple subcellular mRNA distribution patterns in neurons: a nonisotopic in situ hybridization analysis. *J Neurobiol*. **1997**. 33, 473-93.
- 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 alpha1 variants, RARalpha1DeltaB and RARalpha1DeltaBC, define a new class of nuclear receptor isoforms. *Nucleic Acids Res*. **2001**. 29, 4901-08.
- Partridge L, Gems D. Mechanisms of ageing: public or private? *Nat Rev Genet*. **2002**. 3, 165-75.
- Pasinelli P, Ramakers GM, Urban IJ, Hens JJ, Oestreicher AB, de Graan PN, Gispen WH. Long-term potentiation and synaptic protein phosphorylation. *Behav Brain Res*. **1995**. 66, 53-59.
- Pasquini JM, Adamo AM. Thyroid hormones and the central nervous system. *Dev Neurosci*. **1994**. 16, 1-8.
- Perdigo NW Jr. Neurotransmitter receptor plasticity in aging. *Life Sci*. **1994**. 55, 1985-91.
- Perez P, Sanchez-Pacheco A, Pascual A, Aranda A. Retinoic acid decreases thyroid hormone receptor expression in pituitary GH1 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. **1991**. 181, 9-15,.
- 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*. **2000**. 275, 1307-14.
- Petkovitch M, Brand NJ, Krust A, Chambon P. A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors. *Nature*. **1987**. 330, 444-50,.
- Petty KJ, Desvergne B, Mitsuhashi T, Nikodem VM. Identification of a thyroid hormone response element in the malic enzyme gene. *J Biol Chem*. **1990**. 265, 7395-400.
- 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*. **2003**. 27, 1860-66.
- Pinna G, Hiedra L, Prengel H, Broedel O, Eravci M, Meinhold H, Baumgartner A. Extraction and quantification of thyroid hormones in selected regions and subcellular fractions of the rat brain. *Brain Res Brain Res Protoc*. **1999**. 4, 19-28.
- 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*. **2002**. 67, 471-83.
- Piosik PA, van Groenigen M, Ponne NJ, Bolhuis PA, Baas F. RC3/neurogranin structure and expression in the caprine brain in relation to congenital hypothyroidism. *Brain Res Mol Brain Res*. **1995**. 29, 119-30.
- 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*. **1995**. 319, 457-63.
- 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*. **2003**. 254, 188-99.
- Poldrack RA, Packard MG. Competition among multiple memory systems: converging evidence from animal and human brain studies. *Neuropsychologia*. **2003**. 41, 245-51.

- Porterfield SP, Hendrich CE. The role of thyroid hormones in prenatal and neonatal neurological development--current perspectives. *Endocr Rev.* **1993.** 14,94-106.
- 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.* **2003.** 140, 67-73.
- Prinz PN, Scanlan JM, Vitaliano PP, Moe KE, Borson S, Toivola B, Merriam GR, Larsen LH, Reed HL. Thyroid hormones: positive relationships with cognition in healthy, euthyroid older men. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* **1999.** 54, M111-6.
- Puymirat J, Mieke M, Marchand R, Sarlieve L, Dussault JH. Immunocytochemical localization of thyroid hormone receptors in the adult rat brain. *Thyroid.* **1991.** 1, 173-84.

- Q -

- 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.* **2001.** 98, 11668-73.

- R -

- Radomska-Pandya A, Chen G, Czernik PJ, Little JM, Samokyszyn VM, Carter CA, Nowak G. Direct interaction of all-trans-retinoic acid with protein kinase C (PKC). Implications for PKC signaling and cancer therapy. *J Biol Chem.* **2000.** 275, 22324-30.
- 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.* **2000.** 286, 53-56.
- Rastinejad F. Retinoid X receptor and its partners in the nuclear receptor family. *Curr Opin Struct Biol.* **2001.** 11, 33-38.
- Ravaglia G, Forti P, Maioli F, Nesi B, Pratelli L, Savarino L, Cucinotta D, Cavalli G. Blood micronutrient and thyroid hormone concentrations in the oldest-old. *J Clin Endocrinol Metab.* **2000.** 85, 2260-65.
- Redish AD. The hippocampal debate: are we asking the right questions? *Behav Brain Res.* **2001.** 127, 81-98.
- Refetoff S, Nicoloff JT. Thyroid hormone transport and metabolism. *Endocrinology.* (éd. DeGroot LJ, Besser M, Burger HG, et al.; Philadelphia: WB Saunders) 3<sup>rd</sup> ed., **1995.** 560-82.
- Ritchie JW, Shi YB, Hayashi Y, Baird FE, Muchekehu RW, Christie GR, Taylor PM. A role for thyroid hormone transporters in transcriptional regulation by thyroid hormone receptors. *Mol Endocrinol.* **2003.** 17, 653-61.
- Robert L. Les horloges biologiques. *Champs, Flammarion, France.* **1996.**
- Robert L. Vieillissement du cerveau & démences. *Nouvelle Bibliothèque Scientifique. Flammarion, France.* **1998.**
- Roberts CG, Ladenson PW. Hypothyroidism. *Lancet.* **2004.** 363, 793-803.
- Rodriguez-Peña A, Ibarrola N, Iniguez MA, Munoz A, Bernal J. Neonatal hypothyroidism affects the timely expression of myelin-associated glycoprotein in the rat brain. *J Clin Invest.* **1993.** 91, 812-18.
- 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.* **1998.** 128, 1681-7.

- Ross AC, Zolfaghari R, Weisz J. Vitamin A: recent advances in the biotransformation, transport, and metabolism of retinoids. *Curr Opin Gastroenterol.* **2001.** 17, 184-92.
- Ross AC. Retinoid production and catabolism: role of diet in regulating retinol esterification and retinoic acid oxidation. *J Nutr.* **2003.** 133, 291S-296S.
- Ross AC, Zolfaghari R. Regulation of hepatic retinol metabolism: perspectives from studies on vitamin A status. *J Nutr.* **2004.** 134, 269S-275S.
- 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.* **2000.** 97, 7657-62.
- 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.* **1993.** 118, 2672-82.
- Rutten BP, Korr H, Steinbusch HW, Schmitz C. The aging brain: less neurons could be better. *Mech Ageing Dev.* **2003.** 124, 349-55.

- S -

- Sachs LM, Jones PL, Havis E, Rouse N, Demeneix BA, Shi YB. Nuclear receptor corepressor recruitment by unliganded thyroid hormone receptor in gene repression during *Xenopus laevis* development. *Mol Cell Biol.* **2002.** 22, 8527-38.
- Sadow PM, Chassande O, Koo EK, Gauthier K, Samarut J, Xu J, O'Malley BW, Weiss RE. Regulation of expression of thyroid hormone receptor isoforms and coactivators in liver and heart by thyroid hormone. *Mol Cell Endocrinol.* **2003.** 203, 65-75.
- 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.* **1997.** 94, 14349-54.
- Samuels MH. Subclinical thyroid disease in the elderly. *Thyroid.* **1998.** 8, 803-13.
- Santini F, Pinchera A, Ceccarini G, Castagna M, Rosellini V, Mammoli C, Montanelli L, Zucchi V, Chopra IJ, Chiovato L. Evidence for a role of the type III-iodothyronine deiodinase in the regulation of 3,5,3'-triiodothyronine content in the human central nervous system. *Eur J Endocrinol.* **2001.** 144, 577-83.
- Sap J, Munoz A, Damm K, Goldberg Y, Ghysdael J, Leutz A, Beug H, Vennstrom B. The c-erb-A protein is a high-affinity receptor for thyroid hormone. *Nature.* **1986.** 31, 324, 635-40.
- 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.* **2000.**, 20, 289-96.
- 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.* **1994.** 16, 255-59.
- Scheibe RJ, Wagner JA. Retinoic acid regulates both expression of the nerve growth factor receptor and sensitivity to nerve growth factor. *J Biol Chem.* **1992.** 267, 17611-16.
- Schinder AF, Poo M. The neurotrophin hypothesis for synaptic plasticity. *Trends Neurosci.* **2000.** 23, 639-45.



- Schräder 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.* **1994.** 13, 333-41.
- Schreiber G. The evolutionary and integrative roles of transthyretin in thyroid hormone homeostasis. *J Endocrinol.* **2002.** 175, 61-73.
- Segura C, Alonso M, Perez-Fernandez R. Retinoid X receptor mRNA expression in human pituitary gland. *J Physiol Biochem.* **2000.** 56, 101-05.
- Selkoe DJ. Introducing transglutaminase into the study of Alzheimer's disease. A personal look back. *Neurochem Int.* **2002.** 40, 13-16.
- Shakravarty B, Morley P, Whitfield J. Ca<sup>2+</sup>-Calmodulin and protein kinase Cs : a hypothetical synthesis of their conflicting convergences on shared substrate domains. *TINS.* **1999.** 22, 12-16.
- 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.* **2002.** 22, 239-47.
- Shupnik MA, Chin WW, Ridgway EC. T3 regulation of TSH gene expression. *Endocr Res.* **1989.** 15, 579-99.
- 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.* **2002.** 29, 775-82.
- 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.* **2003.** 278, 391-99.
- Sladek FM, Ruse MD Jr, Nepomuceno L, Huang SM, Stallcup MR. Modulation of transcriptional activation and coactivator interaction by a splicing variation in the F domain of nuclear receptor hepatocyte nuclear factor 4alpha1. *Mol Cell Biol.* **1999.** 19, 6509-22.
- Smanik PA, Liu Q, Furminger TL, Ryu K, Xing S, Mazzaferri EL, Jhiang SM. Cloning of the human sodium iodide symporter. *Biochem Biophys Res Commun.* **1996.** 226, 339-45.
- Smith JE, Borchers R. Environmental temperature and the utilization of beta-carotene by the rat. *J Nutr.* **1972.** 102, 1017-24.
- Smith JW, Evans AT, Costall B, Smythe JW. Thyroid hormones, brain function and cognition: a brief review. *Neurosci Biobehav Rev.* **2002.** 26, 45-60.
- Smith MM, Dawson AG. Effect of triiodothyronine on alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase activities in rat liver. Implications for the control of ethanol metabolism. *Biochem Pharmacol.* **1985.** 34, 2291-96.
- Smith TJ, Davis FB, Deziel MR, Davis PJ, Ramsden DB, Schoenl M. Retinoic acid inhibition of thyroxine binding to human transthyretin. *Biochim Biophys Acta.* **1994.** 1199, 76-80.
- Soderling TR. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II: role in learning and memory. *Mol Cell Biochem.* **1993.** 127-128, 93-101.
- Soderling TR, Chang B, Brickey D. Cellular signaling through multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol Chem.* **2001.** 276, 3719-22.
- Spannaus-Martin DJ, Martin BL. In vitro effect of retinoids on calcineurin activity. *Biochem Pharmacol.* **2000.** 60, 803-08.

- Sporn MB, Dunlop NM, Newton DL, Smith JM. Prevention of chemical carcinogenesis by vitamin A and its synthetic analogs (retinoids). *Fed Proc* **1976**. 35, 1332-38.
- Sporn MB, Roberts AB, Goodman DS. *The retinoids. Biology, Chemistry and Medicine*, 2<sup>th</sup> édition (New York: Raven Press), **1994**.
- Squire LR. Memory systems. *C R Acad Sci III*. **1998**. 321, 153-56.
- Starr P. The definition and diagnosis of hypothyroidism. *J Am Geriatr Soc*. **1959**. 7, 105-13.
- Steinmetz J, Spyckerelle Y, Fournier B, de Talance N, Giordanella JP. Three-year follow-up of infraclinical hypothyroidism: course in a cohort of 97 women aged 45 to 70 years attending healthcare screening centers. *Ann Endocrinol (Paris)*. **2002**. 63, 505-10.
- Sterling P, Eyer J. Allotaxis: a new paradigm to explain arousal pathology. In Fisher S, Reason J, editors. *Handbook of life stress, cognition and health*. New-York: Wiley, **1988**. 629-49.
- St Germain DL, Schwartzman RA, Croteau W, Kanamori A, Wang Z, Brown DD, Galton VA. A thyroid hormone-regulated gene in *Xenopus laevis* encodes a type III iodothyronine 5-deiodinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1994**. 91, 7767-71.
- 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. *Endocrinology*. **1997**. 138, 635-41.
- Sundboom J, Olson JA. Effect of aging on the storage and catabolism of vitamin A in mice. *Exp Gerontol*. **1984**. 19, 257-65.
- Sugawara M, Hagen GA. Thyroid hormone formation catalyzed by human thyroid peroxidase: a new and physiological measurement of thyroid peroxidase. *J Lab Clin Med*. **1982**. 99, 580-88.
- Sugiyama D, Kusuhara H, Taniguchi H, Ishikawa S, Nozaki Y, Aburatani H, Sugiyama Y. Functional characterization of rat brain-specific organic anion transporter (Oatp14) at the blood-brain barrier: high affinity transporter for thyroxine. *J Biol Chem*. **2003**. 278, 43489-95.
- 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*. **2001**. 12, 99-104.
- Surks MI, Ortiz E, Daniels GH, Sawin CT, Col NF, Cobin RH, Franklyn JA, Hershman JM, Burman KD, Denke MA, Gorman C, Cooper RS, Weissman NJ. Subclinical thyroid disease: scientific review and guidelines for diagnosis and management. *JAMA*. **2004**. 291, 228-38.
- Szabolcs I, Podoba J, Feldkamp J, Dohan O, Farkas I, Sajgo M, Takats KI, Goth M, Kovacs L, Kressinszky K, Hnilica P, Szilagyi G. Comparative screening for thyroid disorders in old age in areas of iodine deficiency, long-term iodine prophylaxis and abundant iodine intake. *Clin Endocrinol (Oxf)*. **1997**. 47, 87-92.

- T -

- Taura M, Izumi M, Nagataki S. Release of thyroid hormone from circulating thyroglobulin in the rat. *Acta Endocrinol (Copenh)*. **1986**. 111, 209-12.
- Taurog A, Dorris ML, Doerge DR. Mechanism of simultaneous iodination and coupling catalyzed by thyroid peroxidase. *Arch Biochem Biophys*. **1996**., 330, 24-32.
- The 3C study group. Vascular factors and risk of dementia: design of the three-city study and baseline characteristics of the study population. *Neuroepidemiology*. **2003**. 22, 316-25.

- Thompson CC. Thyroid hormone-responsive genes in developing cerebellum include a novel synaptotagmin and a hairless homolog. *J Neurosci.* **1996.** 16, 7832-40.
- Thompson J, Moore SE, Walsh FS. Thyroid hormones regulate expression of the neural cell adhesion molecule in adult skeletal muscle. *FEBS Lett.* **1987.** 219, 135-38.
- Thompson Haskell G, Maynard TM, Shatzmiller RA, Lamantia AS. Retinoic acid signaling at sites of plasticity in the mature central nervous system. *J Comp Neurol.* **2002.** 452, 228-41.
- Thomopoulos P. Thyroid hormone production and its regulation. *Rev Prat.* **1998.** 48, 1987-91.
- Tienboon P, Unachak K. Iron deficiency anaemia in childhood and thyroid function. *Asia Pac J Clin Nutr.* **2003.** 12, 198-202.
- Torresani J, DeGroot LJ. Triiodothyronine binding to liver nuclear solubilized proteins in vitro. *Endocrinology.* **1975.** 96, 1201-9.
- 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.* **1999.** 126, 1317-26.
- Tremont G, Stern RA, Westervelt HJ, Bishop CL, Davis JD. Neurobehavioral functioning in thyroid disorders. *Med Health R I.* **2003.** 86, 318-22.
- Troen BR. The biology of aging. *Mt Sinai J Med.* **2003.** 70, 3-22.
- Tucholski J, Lesort M, Johnson GV. Tissue transglutaminase is essential for neurite outgrowth in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neuroscience.* **2001.** 102, 481-91.
- Tunbridge WM, Evered DC, Hall R, Appleton D, Brewis M, Clark F, Evans JG, Young E, Bird T, Smith PA. The spectrum of thyroid disease in a community: the Wickham survey. *Clin Endocrinol (Oxf).* **1977.** 7, 481-93.

- U -

- 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.* **1991.** 65, 1255-66.
- Unverzagt FW, Gao S, Baiyewu O, Ogunniyi AO, Gureje O, Perkins A, Emsley CL, Dickens J, Evans R, Musick B, Hall KS, Hui SL, Hendrie HC. Prevalence of cognitive impairment: data from the Indianapolis Study of Health and Aging. *Neurology.* **2001.** 57, 1655-62.

- V -

- van Bennekum AM, Wei S, Gamble MV, Vogel S, Piantedosi R, Gottesman M, Episkopou V, Blaner WS. Biochemical basis for depressed serum retinol levels in transthyretin-deficient mice. *J Biol Chem.* **2001.** 276, 1107-113.
- 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.* **2004.** 43, 26-30.
- Van Doorn J, van der Heide D, Roelfsema F. Sources and quantity of 3,5,3'-triiodothyronine in several tissues of the rat. *J Clin Invest.* **1983.** 72, 1778-92.
- Vara H, Martinez B, Santos A, Colino A. Thyroid hormone regulates neurotransmitter release in neonatal rat hippocampus. *Neuroscience.* **2002.** 110, 19-28.

- 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*. **2001**. 94, 1-8.
- 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*. **1992**. 122, 2144-52.
- Violante V, Luongo A, Pepe I, Annunziata S, Gentile V. Transglutaminase-dependent formation of protein aggregates as possible biochemical mechanism for polyglutamine diseases. *Brain Res Bull*. **2001**. 56, 169-72.

- W -

- Wagner E, Drager UC. Retinoic acid synthesis in the postnatal mouse brain marks distinct developmental stages and functional systems. *Cereb Cortex*. **2002**. 12, 1244-53.
- Wan YJ. Retinoic acid and its receptors. *Am J Surg*. **1993**. 166, 50-53.
- 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*. **1994**. 210, 56-61.
- Wang YZ, Christakos S. Retinoic acid regulates the expression of the calcium binding protein, calbindin-D28K. *Mol Endocrinol*. **1995**. 9, 1510-21.
- Watson JB, Szijan I, Coulter PM 2<sup>nd</sup>. Localization of RC3 (neurogranin) in rat brain subcellular fractions. *Brain Res Mol Brain Res*. **1994**. 27, 323-28.
- Wei LN, Lee CH, Filipeik 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*. **1997**. 155, 35-46.
- Weinberger C, Thompson CC, Ong ES, Lebo R, Gruol DJ, Evans RM. The c-erb-A gene encodes a thyroid hormone receptor. *Nature*. **1986**. 324, 641-46.
- Werner EA, Deluca HF. Retinoic acid is detected at relatively high levels in the CNS of adult rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. **2002**. 282, E672-E678.
- Weston AD, Blumberg B, Underhill TM. Active repression by unliganded retinoid receptors in development: less is sometimes more. *J Cell Biol*. **2003**. 161, 223-28.
- White NM, McDonald RJ. Multiple parallel memory systems in the brain of the rat. *Neurobiol Learn Mem*. **2002**. 77, 125-84.
- Wickelgren I. For the cortex, neuron loss may be less than thought. *Science*. **1996**. 273, 48-50.
- Williams GR. Cloning and characterization of two novel thyroid hormone receptor beta isoforms. *Mol Cell Biol*. **2000**. 20, 8329-42.
- 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*. **1987**. 149, 510-14.
- Wolf G. The regulation of the thyroid-stimulating hormone of the anterior pituitary gland by thyroid hormone and by 9-cis-retinoic acid. *Nutr Rev*. **2002**. 60, 374-77.
- 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*. **1989**. 264, 14601-4.

Wrutniak-Cabello C, Casas F, Cabello G. Thyroid hormone action in mitochondria. *J Mol Endocrinol.* **2001.** 26, 67-77.

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.* **1994.** 56, 840-45.

- Y -

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.* **1993.** 14, 183-90.

Yamagata T, Momoi MY, Yanagisawa M, Kumagai H, Yamakado M, Momoi T. Changes of the expression and distribution of retinoic acid receptors during neurogenesis in mouse embryos. *Brain Res Dev Brain Res.* **1994.** 77, 163-76.

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.* **2000.** 14, 2119-27.

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.* **1991.** 88, 3559-63.

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.* **1994.** 18, 587-91.

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.* **1992.** 267, 23448-52.

Yen PM, Chin WW. Molecular mechanisms of dominant negative activity by nuclear hormone receptors. *Mol Endocrinol.* **1994.** 8, 1450-4.

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

Yiannakouris N, Valcana T. Effects of hypothyroidism on RNA synthesis in the adult rat brain. *Neurochem Res.* **1994.** 19, 1325-32.

Ylikomi T, Bocquel MT, Berry M, Gronemeyer H, Chambon P. Cooperation of proto-signals for nuclear accumulation of estrogen and progesterone receptors. *EMBO J.* **1992.** 11, 3681-94.

- Z -

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.* **2002.** 40, 1301-7.

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.* **1994.** 62, 899-918.

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.* **1999.** 11, 407-16.

Zgombic M, Duester G. DNA elements mediating retinoid and thyroid hormone regulation of alcohol dehydrogenase gene expression. *Adv Exp Med Biol.* **1993.** 328, 571-80.

Zhang J, Lazar MA. The mechanism of action of thyroid hormones. *Annu Rev Physiol.* **2000.** 62, 439-66.

- Zhang W, Brooks RL, Silversides DW, West BL, Leidig F, Baxter JD, Eberhardt NL. Negative thyroid hormone control of human growth hormone gene expression is mediated by 3'-untranslated/3'-flanking DNA. *J Biol Chem.* **1992.** 267, 15056-63.
- Zhang QY, Dunbar D, Kaminsky L. Human cytochrome P-450 metabolism of retinals to retinoic acids. *Drug Metab Dispos.* **2000.** 28, 292-97.
- 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.* **1996.** 240, 15-22.
- Zhou J, Weiner H. Binding of thyroxine analogs to human liver aldehyde dehydrogenases. *Eur J Biochem.* **1997.** 245, 123-28.
- Zoeller RT. Transplacental thyroxine and fetal brain development. *J Clin Invest.* **2003.** 111, 954-57.
- 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.* **2000.** 41, 2024-34.
- 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.* **1994.** 269, 13346-52.

## **ACTION CELLULAIRE DE L'ACIDE RÉTINOÏQUE ET DE LA TRIIODOTHYRONINE AU COURS DU VIEILLISSEMENT : ETUDES EXPERIMENTALES ET BIOMEDICALES**

Divers arguments expérimentaux permettent de faire l'hypothèse que des modifications dans le statut nutritionnel et hormonal peuvent être impliquées dans l'apparition des altérations neurobiologiques liées au vieillissement. L'objectif de notre recherche était d'étudier les conséquences du vieillissement sur l'activité des voies de signalisation de l'acide rétinoïque (AR) et de la triiodothyronine (T3).

Nous avons d'abord comparé, dans le cerveau de rats, les effets de l'âge et d'une carence en vitamine A sur les activités des voies de signalisation de l'AR et de la T3 et sur certains de leurs gènes cibles impliqués dans les phénomènes de plasticité synaptique. Nos résultats montrent que (i) le vieillissement et la carence vitaminique A entraînent une diminution de l'expression des récepteurs nucléaires de l'AR et de la T3 et de leurs gènes cibles et que (ii) l'administration d'AR ne permet de réactiver que sa propre voie de signalisation; alors que l'administration de T3 est capable de restaurer l'expression de l'ensemble des gènes étudiés. Ces résultats mettent en évidence qu'un niveau optimum d'activité de la voie d'action de la T3 est indispensable au maintien de la fonctionnalité de l'AR.

Nous avons ensuite éprouvé cette hypothèse chez l'Homme et étudié les effets du vieillissement et d'une hypothyroïdie sur les voies d'action de l'AR et de la T3 dans les cellules mononucléées du sang. Nos résultats apportent la preuve (i) d'une hypoexpression des récepteurs nucléaires de l'AR et de la T3 liée à l'âge et (ii) qu'une hypothyroïdie s'accompagne d'altérations de la voie d'action de l'AR. Ces données mettent en évidence une diminution de l'activité des voies de signalisation de l'AR et de la T3 chez l'Homme.

Nos résultats plaident en faveur de l'hypothèse selon laquelle des dérégulations, même faibles, du niveau d'expression des récepteurs nucléaires pourraient contribuer aux processus de vieillissement de l'individu et aux pathologies qui lui sont associées.

### **- MOTS CLES -**

Acide rétinoïque (AR) - Triiodothyronine (T3) - Récepteurs nucléaires – Vieillissement - Carence vitaminique A – Hypothyroïdie – Animal – Homme – Cerveau - Cellules mononucléées du sang

## **THE CELLULAR ACTION OF RETINOIC ACID AND TRIIODOTHYRONINE DURING AGING: EXPERIMENTAL AND BIOMEDICAL STUDIES**

Several data allowed to hypothesize that alterations of hormonal and nutritional statutes could be involved in age-related neurobiological damages. The aim of our investigation was to determine the effect of ageing on the vitamin A (retinoic acid, RA) and thyroid hormones (triiodothyronine, T3) signalling pathways.

In rat brain, we have first compared the effects of ageing and vitamin A deficiency (VAD) on RA and T3 signalling pathways and on RA and T3 target genes involved in synaptic plasticity. Our results allowed us to demonstrate that (i) RA and T3 signalling pathways (nuclear receptors and target genes) were simultaneously decreased in these situations and that (ii) RA administration was sufficient to regulate its own signalling, whereas T3 administration alone induced normalization of the age-related retinoid and thyroid signalling pathways. These results suggested that an optimal T3 signalling level was required to RA cellular action maintenance.

Afterwards, we attempt to test our hypothesis in humans. Two biomedical studies performed on elderly and hypothyroid subjects allowed us to prove (i) a simultaneous hypoexpression of RA and T3 nuclear receptors in peripheral blood mononuclear cells from aged subjects and (ii) that hypothyroidism was a situation in which vitamin A signalling pathway was altered. These data suggested that a down-regulation of RA and T3 signalling occurred with ageing or hypothyroidism in humans.

These results provide new arguments about a hypothesis assuming that a slight nuclear receptor down-regulation could contribute to ageing processes and/or age-related pathologies.

### **- KEY WORDS -**

Retinoic Acid (RA) - Triiodothyronine (T3) – Nuclear Receptors – Ageing – Vitamin A deficiency – Hypothyroidism – Animal – Human – Brain – Blood mononuclear cells