



HAL
open science

Rôle du récepteur nucléaire ROR α dans la survie et la différenciation neuronale

Fatiha Boukhtouche

► **To cite this version:**

Fatiha Boukhtouche. Rôle du récepteur nucléaire ROR α dans la survie et la différenciation neuronale. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2006. Français. NNT: . tel-00080417v1

HAL Id: tel-00080417

<https://theses.hal.science/tel-00080417v1>

Submitted on 16 Jun 2006 (v1), last revised 12 Jul 2006 (v2)

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE - PARIS 6

Spécialité : **NEUROSCIENCES**

Ecole Doctorale Cerveau-Cognition-Comportement

Présentée par

Fatiha Boukhtouche

Pour obtenir le grade de DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS VI

**Rôle du récepteur nucléaire ROR α
dans la survie et la différenciation
neuronale**

Soutenue le 14 mars 2006, devant le jury composé de:

Pr Alain Trembleau	Président du jury
Pr Jacques Samarut	Rapporteur
Dr Josef Kapfhammer	Rapporteur
Dr Patricia Gaspar	Examineur
Dr Bernard Brugg	Examineur
Pr Jean Mariani	Directeur de thèse

A mes parents,
A Nonno

Remerciements

C'est avec une certaine émotion que j'écris ces remerciements. Beaucoup de personnes auront contribué, de près ou de loin, sur le plan scientifique ou personnel, à l'aboutissement de ce travail.

Mes remerciements vont tout d'abord au **Pr Jean Mariani**. Merci pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et pour avoir dirigé cette thèse. Je tiens à le remercier pour son encadrement scientifique, pour m'avoir guidée, pour m'avoir donné les moyens de mener ce projet au mieux, et pour toute la confiance qu'il m'a accordée et toute l'autonomie qu'il m'a permis d'avoir. J'ai ainsi réussi - je pense - à m'investir au mieux afin de réussir ce projet scientifique et personnel qu'est une thèse. Je tiens aussi et surtout à le remercier pour tout son soutien, toute sa disponibilité en dépit d'un emploi du temps ô combien chargé, ses nombreux encouragements, et aussi pour ses qualités humaines. Je pense avoir énormément appris, et j'espère que je saurai à l'avenir appliquer tout ses conseils. Merci aussi pour tous les agréables moments et les rires partagés au labo! Tout cela aura contribué à ce que ma thèse soit ce qu'elle est... et j'espère de tout cœur qu'elle est à la hauteur de ce qu'il espérait. Donc, un GRAND MERCI Jean!

Merci également au **Dr Bernard Brugg** d'avoir participé à la direction de cette thèse, merci pour son aide, son soutien et ses encouragements, sa constante bonne humeur, et nos nombreuses discussions constructives. Il m'aura lui aussi permis une grande autonomie, et encouragé dans mes initiatives. Donc, merci Bernard!

Je tiens à remercier chaleureusement les membres de mon jury: le **Pr Jacques Samarut** et le **Dr Josef Kapfhammer** pour avoir accepté la lourde tâche de rapporteur, le **Pr Alain Trembleau** d'avoir accepté de présider cette thèse, et le **Dr Patricia Gaspar** d'avoir accepté le rôle d'examineur, après avoir été quelques années plus tôt rapporteur de mon DEA.

Merci à **Yolande Lemaigre-Dubreuil** pour sa contribution et son aide, ses conseils et son soutien, en particulier pendant mon DEA et au début de cette thèse. Merci pour les très rigoureuses corrections des textes divers. Merci pour sa grande disponibilité au milieu de ses très nombreux enseignements.

Merci également au **Dr Jacques Mallet** de m'avoir permis de réaliser les vecteurs lentiviraux dans son labo, au LGN. Il m'a donc permis de réaliser une grande partie des expériences de cette thèse, en étroite collaboration avec le **Dr Guilan Vodjdani**. Merci à Hamid Mammeri et Chamzy Sarkis pour leurs conseils en vecteurs viraux avant de commencer cette collaboration, et à **tous les membres du LGN** qui ont toujours été disponibles et accueillants lors de mes nombreux passages au labo. J'ai passé dans ce labo des moments très agréables et appris beaucoup de choses.

Je tiens à adresser tout particulièrement mes remerciements très chaleureux à **Guilan Vodjdani**, qui m'a encadrée pour la construction et l'utilisation des virus, et avec qui j'ai beaucoup appris techniquement et scientifiquement. Elle a toujours été prête à m'aider sur le plan scientifique et aussi personnel. Ses conseils, son soutien et son écoute ont été des plus utiles dans l'aboutissement de cette thèse. Merci Guilan, tu as toute mon amitié, et je souhaite avoir la tienne!

Mes remerciements s'adressent également à **Isabelle Dusart**, pour toute son aide et tout son intérêt. J'ai énormément apprécié nos discussions, son regard critique et j'ai beaucoup appris

à ses côtés. J'admire cette grande curiosité scientifique dont elle fait preuve. Un grand merci donc, Isabelle, pour tout ce que tu m'as apporté, et pour l'exemple que tu es. Travailler et interagir avec toi a été une grande chance pour moi, merci!!!

Merci également à **Rosine Wehrlé** qui m'a appris des techniques d'histologie et de culture de cervelet. Merci Rosine pour ta gentillesse, ta disponibilité et ta patience.

Merci à **Joelle Bakouche** pour son aide technique et pour avoir partagé mon bureau de façon si agréable, pour son écoute, son soutien, sa présence chaleureuse, et pour avoir supporté l'ordre (!!!) de mon bureau...

Merci à **tous les membres du labo DVSN**, qui ont tous toujours été prêts à m'aider ou me conseiller, qui ont toujours été disposés à écouter une répétition d'un topo, à relire un texte... Donc, merci à tous, et en particulier à **Béatrice Vernet Der-Garabedian** qui m'aura initiée à l'expérimentation à mon arrivée dans le labo en maîtrise, à **Florence Frederic** pour son aide en analyses statistiques et pour nos nombreuses discussions et à **Hadi Zanjani** pour son aide en histologie, à **Christopher Jarvis** pour ses conseils en biologie moléculaire, à **Vanessa Gautheron** pour son aide en culture. Un merci tout particulier aussi à **Ann Lohof** pour ses conseils et la relecture des manuscrits en anglais... et pour ses conseils de prononciation ("R" dans "RT-PCR"...), à **Françoise Bazire** qui a toujours été d'une grande efficacité dans la bonne humeur, à **Mohamed Doulazmi** toujours disponible pour les problèmes informatiques...

Merci également à tous les étudiants du labo, **Aline, Sandrine, Nicolas, Sonja, Nathalie, Géraldine, Mathieu, Alexandra, Mélina** et **Benoît**, pour leur aide, leur amitié et tous les moments agréables qu'on a pu partager...

Un merci tout particulier à ceux qui ont toujours été présents dans et hors du labo, en particulier **Nicolas, Vanessa, Mathieu, Géraldine, Sonja** et aussi à **Delphine**. Merci pour nos longues discussions, pauses cafés ou déjeuner, votre écoute, votre enthousiasme dans les moments heureux, votre soutien dans les moments plus difficiles, et tout simplement pour m'avoir supportée... Vous êtes tous devenus pour moi bien plus que des "collègues". J'espère conserver cette amitié longtemps.

Je veux également remercier ici mes **parents**, mes **soeurs** et mes "**grands-parents**" **suisses**, à qui je dois aussi d'en être arrivée là. J'espère qu'ils seront heureux et fiers de cette thèse.

Merci également à tous ceux qui m'ont soutenue, qui ont partagé toutes ces années avec moi, et qui ont permis de me "sortir" des cultures neurones corticaux ou des cellules de Purkinje, avec qui on a tenté de refaire le monde, qui m'ont supporté dans mes mauvais moments, qui ont partagé les heureux moments de ces dernières années: **Sofiane**, les **inévitables thésards** : **ceux du labo** qui se reconnaîtront, **Vincent, Amélie, Thibaut, Julie, Lionel, Jan, Karim, Seb, Annie, Sévé, Laura, Karen, Julien**, ceux que j'aurais oubliés (pardon), et **Pierre**. Merci à vous tous, vous avez tous participé à votre manière!!!

SOMMAIRE

RESUME	4
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	6
ABREVIATIONS	9
AVANT-PROPOS.....	12
INTRODUCTION.....	17
I. LE RECEPTEUR NUCLEAIRE RORα	18
I.1. La superfamille des récepteurs nucléaires : des régulateurs clés du développement, de l'organogenèse et de l'homéostasie	18
<i>I.1.1. Structure des récepteurs nucléaires.....</i>	<i>19</i>
<i>I.1.2. Classification des récepteurs nucléaires</i>	<i>22</i>
<i>I.1.3. Liaison des récepteurs nucléaires à l'ADN</i>	<i>24</i>
<i>I.1.4. Modulation de l'activité transcriptionnelle par les récepteurs nucléaires.....</i>	<i>28</i>
<i>I.1.5. La famille des récepteurs orphelins.....</i>	<i>31</i>
I.2. Le groupe des récepteurs RORα, β, γ.....	32
<i>I.2.1. Clonage des RORs.....</i>	<i>32</i>
<i>I.2.2. Structure des protéines ROR.....</i>	<i>33</i>
<i>I.2.3. Localisation chromosomique des gènes Ror.....</i>	<i>35</i>
<i>I.2.4. Profils d'expression des RORs</i>	<i>35</i>
<i>I.2.5. Fonctions des protéines ROR.....</i>	<i>36</i>
<i>I.2.6. Expression des protéines ROR au cours du rythme circadien.....</i>	<i>37</i>
I.3. RORα et régulation de la transcription.....	38
<i>I.3.1. Modes de liaison à l'ADN</i>	<i>38</i>
<i>I.3.2. RORα, un activateur transcriptionnel?</i>	<i>40</i>
<i>I.3.3. Les co-activateurs et les co-répresseurs de RORα.....</i>	<i>40</i>
<i>I.3.4. Contrôle de l'activation transcriptionnelle par RORα.....</i>	<i>41</i>
<i>I.3.5. Interactions fonctionnelles avec d'autres récepteurs.....</i>	<i>46</i>
I.4. Les gènes cibles de RORα.....	50
I.5. Rôles physiologiques de RORα, un récepteur aux fonctions multiples	57
<i>I.5.1. RORα participe au développement et au vieillissement du cervelet.....</i>	<i>58</i>
<i>I.5.2. RORα et métabolisme de l'os et du cartilage.....</i>	<i>60</i>
<i>I.5.3. RORα, modulateur de l'immunité et de la réaction inflammatoire</i>	<i>61</i>
<i>I.5.4. RORα, métabolisme lipidique et athérosclérose</i>	<i>62</i>
<i>I.5.5. RORα, angiogenèse et système vasculaire</i>	<i>64</i>

I.5.6. <i>RORα participe à la myogenèse</i>	64
I.5.7. <i>RORα et cancérogenèse</i>	65
I.5.8. <i>RORα et hypoxie</i>	66
I.5.9. <i>RORα et rythmes circadiens</i>	67
II. SURVIE & DIFFERENCIATION DES CELLULES DE PURKINJE DU CERVELET	70
II.1. Anatomie générale du cervelet.....	70
II.1.1. <i>Structure du cortex cérébelleux</i>	71
II.1.2. <i>Les afférences du cortex cérébelleux</i>	75
II.1.3. <i>Réseau neuronal du cortex cérébelleux</i>	76
II.1.4. <i>Les noyaux profonds du cervelet</i>	78
II.2. Développement du cervelet.....	79
II.2.1. <i>Développement embryonnaire</i>	80
II.2.2. <i>Provenance des catégories cellulaires cérébelleuses</i>	81
II.3. Survie des cellules de Purkinje	84
II.3.1. <i>Survie neuronale, apoptose et stress oxydatif</i>	84
II.3.2. <i>Mort des cellules de Purkinje pendant le développement et le vieillissement normal</i>	95
II.3.3. <i>Mort non physiologique des cellules de Purkinje</i>	98
II.4. Différenciation des cellules de Purkinje.....	102
II.4.1. <i>Différenciation "biochimique" des cellules de Purkinje</i>	102
II.4.2. <i>Différenciation dendritique des cellules de Purkinje</i>	103
II.4.3. <i>Interactions avec la différenciation des autres cellules : cas des grains</i>	106
II.5. Facteurs influençant la différenciation et la survie des cellules de Purkinje..	109
II.5.1. <i>Influence des facteurs trophiques</i>	109
II.5.2. <i>Rôles des Protéines Kinases C</i>	110
II.5.3. <i>Rôle de l'activité bioélectrique</i>	110
II.5.4. <i>Influence des hormones thyroïdiennes</i>	111
II.5.5. <i>Influence des hormones stéroïdiennes</i>	112
II.6. Rôle du récepteur nucléaire RORα dans la survie et la différenciation des cellules de Purkinje.	113
II.6.1. <i>Pertes neuronales chez le mutant staggerer</i>	114
II.6.2. <i>Différenciation des cellules de Purkinje chez staggerer</i>	115
RESULTATS EXPERIMENTAUX	117
I. ROLE DE RORα DANS LA SURVIE NEURONALE.....	118
I.1. La surexpression de RORα protège les neurones corticaux d'une apoptose induite par un stress oxydatif.....	119
<i>Article I: HRORα1 overexpression protects neurons against oxidative stress-induced apoptosis</i>	119
I.2. La surexpression de RORα permet une meilleure survie des cellules de Purkinje en culture organotypique.....	133

II. ROLE DE RORα DANS LA DIFFERENCIATION NEURONALE.....	136
II.1. RORα contrôle les étapes précoces de la différenciation des cellules de Purkinje.....	137
<i>Article II: RORα controls the early steps of Purkinje cell dendritic differentiation.</i>	137
II.2. L'action de l'hormone thyroïdienne (T₃) dans la différenciation précoce des cellules de Purkinje implique RORα.....	147
<i>Article III: Thyroid hormone (T₃)-induced early PC differentiation involves RORα</i>	147
DISCUSSION	171
I. ACTION DE RORα DANS LA SURVIE NEURONALE	173
I.1. RORα protège les neurones corticaux en culture en régulant le stress oxydatif.	173
I.2. Rôle neuroprotecteur de RORα dans les cellules de Purkinje en culture organotypique	175
I.3. Hypothèses sur l'influence de RORα sur la survie des neurones au cours du développement et du vieillissement.....	176
II. ACTION DE RORα DANS LA DIFFERENCIATION NEURONALE.....	178
II.1. Rôle de RORα dans la différenciation des cellules de Purkinje.....	179
II.2. Rôle des hormones thyroïdiennes dans la différenciation précoce des cellules de Purkinje.....	181
III. L'ETAPE DE REGRESSION DENDRITIQUE EST-ELLE LIEE A UNE APOPTOSE DEVELOPPEMENTALE DES CELLULES DE PURKINJE? CONSEQUENCES CHEZ LE MUTANT <i>STAGGERER</i>	185
CONCLUSIONS & PERSPECTIVES	187
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	190
ANNEXES	213
Liste des Publications.....	214
Article IV: The "CholesteROR" protective pathway in the vascular system.	215
Article V: RORα, a crucial nuclear receptor for Purkinje neuron survival and differentiation: from development to ageing	224

RESUME

ROR α (Retinoic acid receptor related Orphan Receptor α) est un récepteur nucléaire dont la perte de fonction entraîne chez la souris *staggerer* - entre autres phénotypes - une sévère ataxie cérébelleuse. ROR α a longtemps été considéré comme un récepteur nucléaire orphelin, cependant, le cholestérol (ou un de ses dérivés) semble être un ligand physiologique de ce récepteur.

Le mutant *staggerer*, identifié dès 1962 par Sidman, Lane et Dickie, présente une hypoplasie cérébelleuse liée à l'absence de la grande majorité des cellules de Purkinje, ainsi que des grains du cervelet. L'expression de la mutation *staggerer* dans les cellules de Purkinje conduit à leur mort massive pendant le développement, et les cellules de Purkinje survivantes chez l'adulte présentent d'importantes anomalies de différenciation. Par ailleurs, à l'état hétérozygote, le mutant *staggerer* présente une diminution de la survie des cellules de Purkinje ainsi que des anomalies de différenciation au cours du vieillissement.

Le phénotype cérébelleux des mutants homozygote et hétérozygote *staggerer* suggère que ROR α est impliqué dans la survie et/ou la différenciation des cellules de Purkinje au cours du développement et du vieillissement. Au cours de cette thèse, nous avons donc tenté de déterminer le rôle de ROR α dans la survie et la différenciation dans des neurones corticaux et/ou dans des cellules de Purkinje, en étudiant l'effet de sa surexpression dans ces processus.

Afin de surexprimer ROR α , nous avons construit un vecteur lentiviral exprimant l'isoforme humaine ROR α 1. Ce vecteur nous a permis de transduire avec une très grande efficacité des neurones corticaux en culture primaire ainsi que les cellules de Purkinje en culture organotypique.

Dans une première étude, nous avons cherché à déterminer si ROR α pouvait exercer un rôle dans la survie neuronale. Dans ce but, nous avons évalué la survie de neurones corticaux surexprimant ou non ROR α et soumis à un stress oxydatif entraînant l'apoptose des neurones. ROR α protège les neurones en diminuant le stress oxydatif causé par ces inducteurs pro-apoptotiques. L'expression des deux enzymes Glutathion peroxydase 1 et Peroxiredoxine 6 est augmentée dans les neurones qui surexpriment hROR α 1, et semble partiellement médier l'effet neuroprotecteur de ROR α . Nous avons par ailleurs évalué et comparé la survie des cellules de Purkinje en culture organotypique qui expriment ROR α de façon endogène, ou qui surexpriment hROR α 1, et nos résultats suggèrent que la surexpression de ROR α a également un effet neuroprotecteur dans ces cellules.

Dans une seconde étude, afin de déterminer le rôle de ROR α dans la différenciation des cellules de Purkinje, nous avons analysé en culture la progression de la différenciation dendritique précoce de cellules de Purkinje en fonction de l'expression de ROR α . ROR α est crucial pour l'étape de régression des neurites des cellules de Purkinje au stade bipolaire embryonnaire. Alors que l'absence de ROR α chez les mutants homozygotes *staggerer* entraîne un arrêt de la différenciation des cellules de Purkinje à ce stade (les cellules de Purkinje ne parviennent pas à entamer la régression des neurites), la surexpression de hROR α 1 accélère l'étape de régression. Cette étape de régression est totalement dépendante de l'expression de protéines ROR α fonctionnelles et cet effet est vraisemblablement intrinsèque. Nous montrons enfin que l'hormone thyroïdienne accélère la différenciation dendritique précoce des cellules de Purkinje, et que ROR α semble contribuer à ce processus.

L'ensemble de ces résultats montre que ROR α intervient de façon cruciale à la fois dans la survie et dans la différenciation des cellules de Purkinje dans une étape très précoce de leur développement post-natal.

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

- Figure 1:** Représentation schématique des relations structure/fonction des récepteurs nucléaires.
- Figure 2:** Représentation du DBD.
- Figure 3:** Représentation du LBD du récepteur thyroïdien TR β .
- Figure 4:** Arbre phylogénétique des membres de la superfamille des récepteurs nucléaires.
- Figure 5:** Représentation schématique d'un promoteur d'un gène codant pour un ARNm
- Figure 6:** Promoteur minimal et fixation de la machinerie transcriptionnelle chez les eucaryotes.
- Figure 7:** Mode d'action des complexes ligand-récepteur.
- Figure 8:** Modes de liaison des récepteurs nucléaires à l'ADN.
- Figure 9:** Représentation schématique du mode d'action des récepteurs nucléaires.
- Figure 10:** Comparaison de la structure modulaire des isoformes de ROR α chez l'Homme.
- Figure 11:** Représentation de la fixation de ROR α sur son élément de réponse dans le promoteur des gènes cibles.
- Figure 12:** Le système protéolytique ubiquitine-protéasome.
- Figure 13:** Atrophie cérébelleuse chez le mutant *Rora*^{sg/sg}.
- Figure 14:** Mécanisme du rôle protecteur de ROR α contre l'athérosclérose.
- Figure 15:** Régulation de l'expression des acteurs moléculaires du rythme circadien chez les mammifères.
- Figure 16:** Rôles physiologiques de ROR α .
- Figure 17:** Anatomie du cervelet.
- Figure 18:** Organisation cytoarchitectonique du cervelet.
- Figure 19:** Cellules de Purkinje adultes.
- Figure 20:** Représentation schématique du motif élémentaire de connexions synaptiques du cervelet.
- Figure 21:** Représentation des différentes afférences et efférences du cervelet.
- Figure 22:** Coupes sagittales de cervelet de souris à différents stades de développement.

- Figure 23:** Représentation schématique des territoires présomptifs du cervelet et de l'olive inférieure.
- Figure 24:** Représentation schématique du développement de la lame cérébelleuse.
- Figure 25:** Représentation de l'épithélium générant les grains (EGL) et l'épithélium ventriculaire germinatif du IV^{ème} ventricule.
- Figure 26:** Migrations neuronales dans le cortex cérébelleux en développement.
- Figure 27:** Morphologie d'une cellule apoptotique.
- Figure 28:** Les deux grandes voies apoptotiques.
- Figure 29:** La chaîne respiratoire mitochondriale et la production d' O₂^{-•}.
- Figure 30:** Schéma représentant la production et la clairance enzymatique des radicaux libres.
- Figure 31:** Le cervelet des souris surexprimant Bcl2.
- Figure 32:** Différenciation des cellules de Purkinje.
- Figure 33:** Différenciation et synaptogenèse du cortex cérébelleux de rat.
- Figure 34:** Schéma représentant la différenciation des grains en provenance de la couche des grains externe.
- Figure 35:** Cellules de Purkinje du mutant homozygote *staggerer*.
- Figure 36:** Survie des cellules de Purkinje surexprimant hRORα1 en culture organotypique.
- Table 1:** Gènes cibles potentiels de RORα.

ABBREVIATIONS

AF	Fonction d'activation (<i>Activation Function</i>)
AT	Ataxie Telangiectasie
apoA-I	Apolipoprotéine A-I
apoC-III	Apolipoprotéine C-III
APP	<i>β-Amyloid Precursor Protein</i>
BFE	<i>BiFunctional Enzyme</i>
bHLH	<i>basic Helix-Loop-Helix</i>
BSP	<i>Bone SialoProtein</i>
CAF	<i>CBP-Associated Factor</i>
CaM	Calmoduline
CaMK	CaM Kinases
CBP	<i>CREB-Binding Protein</i>
CGE	Couche des grains externe
CGI	Couche des grains interne
CIP	<i>CBP-Interacting Protein</i>
COUP-TF1	<i>Chicken Ovalbumin Upstream Promoter-Transcription Factor I</i>
COX	Cyclooxygénase
CTE	Extension carboxy-terminale (<i>Carboxy-Terminal Extension</i>)
DBD	Domaine de fixation à l'ADN (<i>DNA Binding Domain</i>)
DR	Répétition directe (<i>Direct Repeat</i>)
DRIP	<i>Vitamin D₃ Receptor Interacting Protein</i>
eNOS	<i>endothelial NO Synthase</i>
EGL	CGE (<i>External Granular Layer</i>)
ER	Répétition éversée (<i>Everted Repeat</i>)
ERR	<i>Estrogen-related receptor</i>
GPx	glutathion peroxydase
GR	Récepteur des glucocorticoïdes (<i>Glucocorticoid Receptor</i>)
GRIP	<i>GR-Interacting Protein</i>
GSH	glutathion (réduit)
GSSG	glutathion (oxydé)
HAT	Histone acétyltransférase
HDAC	Histone déacétylase
HDL	<i>High Density Lipoproteins</i>
HIF	<i>Hypoxia Inducible Factor</i>
Hr	Hairless
HRE	Elément de réponse hormonal (<i>Hormone Response Element</i>)
HUVEC	<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>
IGL	CGI (<i>Internal Granular Layer</i>)
IL	Interleukine
IR	Répétition inversée (<i>Inverted Repeat</i>)
LBD	Domaine de fixation du ligand (<i>Ligand Binding Domain</i>)
N-CoR	<i>Nuclear receptor CoRepressor</i>
NGF	<i>Nerve Growth Factor</i>
NLS	Signal de localisation nucléaire (<i>Nuclear Localisation Signal</i>)
NO	Oxyde nitrique
PBP	<i>Peroxisome proliferator-Binding Protein</i>
Pcd	<i>Purkinje cell degeneration</i>
PCP	<i>Purkinje-Cell Protein</i>
PKC	<i>Protein Kinase C</i>
PPAR	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor</i>

Prx	peroxiredoxine
RAR	Récepteur de l'acide rétinoïque (<i>Retinoic Acid Receptor</i>)
RLO	Radicaux libres oxygénés
ROR	<i>RAR-related Orphan Receptor</i>
RORE	Elément de réponse des RORs (<i>ROR-Response Element</i>)
ROS	espèces réactives de l'oxygène, ou RLO (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
RXR	<i>Retinoid X Receptor</i>
RZR	<i>Retinoic-Z Receptor</i>
SCA	Ataxie spino-cérébelleuse (<i>SpinoCerebellar Ataxia</i>)
SHH	Sonic hedgehog
SMRT	<i>Silencing Mediator for RAR and TR</i>
SOD	Superoxydismutase
SRC	<i>Steroid Receptor Coactivator</i>
TAF	<i>TBP Associated Factor</i>
TBP	<i>TATA binding protein</i>
TF	<i>Transcription Factor</i>
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
TIF	<i>Transcription Intermediary Factor</i>
TK	<i>Thymidine Kinase</i>
TNFα	<i>Tumor Necrosis Factor α</i>
TOR	<i>Thymus Orphan Receptor</i>
TH	<i>Thyroid Hormone</i>
TR	Récepteur des hormones thyroïdoennes (<i>Thyroid hormone Receptor</i>)
TRAP	<i>TR Associated Proteins</i>
TRE	Elément de réponse des TR (<i>Thyroid Hormone-Response Element</i>)
TRIP	<i>T₃ Receptor-Interacting Proteins</i>
Ub	Ubiquitine
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VSMC	<i>Vascular Smooth Muscle Cells</i>

AVANT-PROPOS

Je me suis intéressée, au cours de ma thèse, au rôle du récepteur nucléaire ROR α dans la survie et la différenciation des neurones, en particulier des cellules de Purkinje du cervelet.

Le cervelet constitue un système modèle pour l'étude de plusieurs questions fondamentales en neurobiologie, allant du fonctionnement neuronal ou synaptique le plus élémentaire, à l'établissement de couches corticales, jusqu'aux aspects les plus cognitifs de l'action de ce centre nerveux. Les étapes de développement du cervelet ayant été décrites depuis de nombreuses décennies, il est également un modèle de choix pour l'étude des mécanismes génétiques responsables de la mise en place du cortex cérébelleux, de la survie et de la différenciation des neurones au cours du développement, chez l'adulte, et au cours du vieillissement.

Le dysfonctionnement du cervelet peut entraîner des ataxies cérébelleuses qui se manifestent par un équilibre difficile, une démarche titubante et une incapacité à coordonner les mouvements. Les mutations génétiques affectant le fonctionnement du cervelet peuvent ainsi être isolées sur un crible clinique simple. C'est pourquoi un grand nombre de mutations génétiques spontanées affectant le développement du cervelet a été isolé, dont la mutation *staggerer*.

Le mutant *staggerer*, identifié dès 1962 par Sidman, Lane et Dickie, présente une atrophie cérébelleuse liée à l'absence de la grande majorité des cellules de Purkinje, ainsi que des grains du cervelet. L'expression de la mutation *staggerer* dans les cellules de Purkinje conduit à leur mort massive pendant le développement, et les cellules de Purkinje survivantes chez l'adulte présentent d'importantes anomalies de différenciation. Par ailleurs, à l'état hétérozygote, le mutant *staggerer* présente une diminution de la survie des cellules de Purkinje ainsi que des anomalies de différenciation au cours du vieillissement.

Les progrès du génie génétique ont permis d'identifier le gène muté en 1996: la mutation *staggerer* consiste en une délétion dans le domaine C-terminal du récepteur nucléaire ROR α (Retinoic acid receptor related Orphan Receptor α), conduisant vraisemblablement à la perte de fonction de la protéine.

Les récepteurs nucléaires constituent une famille de facteurs de transcription dont l'activité est le plus souvent régulée par des ligands lipophiles. Alors que les premiers récepteurs nucléaires ont été identifiés puis clonés grâce à la connaissance qu'on avait de leur

ligand (le plus souvent une hormone), de nouveaux récepteurs nucléaires ont été clonés par homologie de séquence avec des membres connus de cette famille. Ainsi, de nombreux récepteurs nucléaires - dont ROR α - ont été clonés sans que l'on ne connaisse ni leur fonction, ni leur ligand. Ces nouveaux récepteurs ont été qualifiés de récepteurs nucléaires orphelins. Outre l'intérêt scientifique, une meilleure compréhension des fonctions ainsi que des modes de régulation de cette famille de facteurs de transcription est d'un intérêt considérable dans le domaine thérapeutique, puisque les récepteurs nucléaires sont des régulateurs clés de divers processus physiologiques comme l'homéostasie, la reproduction, le métabolisme, la différenciation et le développement.

Le phénotype cérébelleux des mutants homozygote et hétérozygote *staggerer* (pertes massive ou progressive des cellules de Purkinje et anomalies dendritiques) **suggère que ROR α est impliqué dans la survie et/ou la différenciation des cellules de Purkinje** au cours du développement et du vieillissement. Cependant, l'analyse histologique du cervelet des mutants ne permet pas de distinguer si ROR α exerce l'un ou l'autre rôle, voire les deux: les processus de survie et de différenciation des neurones au cours du développement étant intimement liés, il est difficile de distinguer la cause primaire de la dégénérescence. Ainsi deux hypothèses se présentaient au début de ma thèse:

1) la perte de fonction de ROR α entraîne de façon primaire un défaut de survie des cellules de Purkinje (qui entraîne en cascade la perte des grains du cervelet), menant à une atrophie sévère du cervelet. En conséquence, les cellules de Purkinje survivantes dans un cervelet atrophique, dépourvues de leurs connexions (en particulier les fibres parallèles, axones des grains) ne peuvent se différencier normalement.

2) la perte de fonction de ROR α entraîne de façon primaire un défaut de différenciation des cellules de Purkinje. Les cellules de Purkinje immatures pourraient ne pas survivre dans le cervelet en développement, en particulier lors de la synaptogenèse des fibres parallèles entraînant les pertes des cellules de Purkinje décrites chez le mutant *staggerer*.

Durant ma thèse, j'ai testé les deux hypothèses: j'ai donc tenté de déterminer si ROR α exerçait un rôle propre dans la survie et/ou dans la différenciation neuronales.

Afin de tester ces hypothèses, nous avons choisi d'adopter une stratégie de surexpression du gène *Rora* dans des cultures de neurones corticaux et cérébelleux.

Les neurones corticaux en culture, qui expriment de façon endogène ROR α à un faible niveau, offrent un modèle qui permet d'évaluer l'effet de la surexpression de ROR α dans une culture de neurones relativement pure et homogène, et qui permet ainsi de réaliser des études moléculaires quantitatives.

Les cultures organotypiques de cervelet quant à elles permettent d'étudier la fonction de ROR α dans les cellules de Purkinje, neurones dans lesquels l'action de ROR α semble indispensable à leur survie.

Les neurones sont des cellules difficiles à transfecter. Ainsi, l'efficacité de la surexpression de ROR α par transfection transitoire d'un plasmide s'est révélée faible dans les neurones corticaux, et nulle dans les cellules de Purkinje. J'ai donc choisi de développer un vecteur lentiviral et de mettre au point les conditions d'infection afin de réaliser la surexpression de ROR α avec une meilleure efficacité. Cette technique s'est révélée très efficace puisque je suis parvenue à transduire la totalité des neurones corticaux en culture, ainsi que la grande majorité des cellules de Purkinje dans des cultures organotypiques de cervelet.

A l'aide des outils de transfection transitoire et de transduction virale, j'ai essayé de répondre aux questions suivantes:

- ***La surexpression de ROR α peut-elle exercer un rôle neuroprotecteur?***

Pour répondre à cette question, j'ai évalué la survie de neurones corticaux surexprimant ou non ROR α et soumis à un stress oxydatif entraînant l'apoptose des neurones. Pour déterminer le mode d'action de ROR α , j'ai ensuite analysé le métabolisme des radicaux libres, la production accrue de radicaux libres étant un facteur causal du déclenchement de l'apoptose dans le modèle utilisé. J'ai également analysé la survie de cellules de Purkinje en culture organotypique qui surexpriment ou non ROR α .

- ***ROR α exerce-t-il un rôle dans la différenciation dendritique des cellules de Purkinje?***

Les cellules de Purkinje présentant des anomalies dendritiques dans le cervelet des mutants *staggerer*, j'ai analysé la progression de la différenciation dendritique de ces cellules en culture organotypique. Par ailleurs, j'ai étudié l'effet de la surexpression de ROR α dans les cellules de Purkinje à différents âges, afin de déterminer la fenêtre temporelle de l'action de ROR α .

Le phénotype du mutant homozygote *staggerer* présente des similitudes avec le phénotype cérébelleux des rongeurs hypothyroïdiens; une interaction entre les voies des hormones thyroïdiennes et de ROR α a donc été suggérée et partiellement démontrée dans la littérature. J'ai souhaité déterminer si une interaction ou une inter-dépendance de ces voies existe dans le processus de différenciation des cellules de Purkinje.

L'introduction de ce manuscrit est divisée en deux parties:

La première partie concerne le récepteur nucléaire ROR α . Après une présentation des récepteurs nucléaires (regroupés en famille), de leur structure et de leur mode d'action, j'aborderai la description de ROR α , de sa régulation de la transcription, de ses gènes cibles et fonctions connus.

La seconde partie concerne les cellules de Purkinje. Après la description du cervelet et de son développement, j'aborderai celle des cellules de Purkinje, en m'intéressant plus particulièrement à leur survie et à leur différenciation au cours du développement et éventuellement du vieillissement, en concluant sur l'influence connue du récepteur nucléaire ROR α dans ces processus.

Les résultats obtenus sont ensuite décrits ou présentés sous forme d'articles, puis je discute, d'après nos connaissances actuelles, des conséquences de ces résultats sur la compréhension du rôle de ROR α dans la différenciation et la survie des neurones, en particulier des cellules de Purkinje.

INTRODUCTION

I. LE RECEPTEUR NUCLEAIRE ROR α

I.1. La superfamille des récepteurs nucléaires : des régulateurs clés du développement, de l'organogenèse et de l'homéostasie

Les récepteurs nucléaires sont des régulateurs clés de divers processus physiologiques comme l'homéostasie, la reproduction, le développement, la différenciation et le métabolisme. Les récepteurs nucléaires forment une grande famille (superfamille) de facteurs de transcription dont l'activité est modulée par la présence de molécules hydrophobes comme les hormones stéroïdiennes (oestrogènes, glucocorticoïdes, minéralocorticoïdes, progestérone, androgènes, vitamine D, ecdysone, oxystérols, acides biliaires), les acides rétinoïques (formes tout-trans et 9-cis), les hormones thyroïdiennes, les acides gras, les leukotriènes et les prostaglandines. La particularité des récepteurs nucléaires est de regrouper en une seule entité protéique la capacité de fixer un ligand, de se fixer à l'ADN, et enfin de réguler la transcription de gènes cibles. Les récepteurs nucléaires établissent donc un lien direct entre les signaux moléculaires intra- ou extra-cellulaires et la réponse transcriptionnelle.

Les premiers membres de la superfamille des récepteurs nucléaires à avoir été décrits sont les récepteurs aux hormones stéroïdiennes comme les récepteurs aux glucocorticoïdes et les récepteurs aux oestrogènes (Weinberger *et al.*, 1985; Green *et al.*, 1986). Très vite, il a été démontré que d'autres membres de cette famille de protéines pouvaient reconnaître des ligands de structure différente comme l'acide rétinoïque ou l'hormone thyroïdienne. Le clonage de ces récepteurs dans la deuxième moitié des années 1980 a permis de mettre en place les bases moléculaires d'un modèle de récepteur nucléaire (Gronemeyer et Laudet, 1995). Cependant, la situation est plus complexe. En effet, en tirant parti du fort pourcentage d'identité de séquences existant entre les récepteurs, il a été cloné un grand nombre de gènes codant pour des récepteurs nucléaires pour lesquels on ne connaissait ni le ligand ni la fonction. Ces nouveaux récepteurs potentiels ont donc été nommés récepteurs orphelins. Ils sont rapidement devenus majoritaires dans la famille. A part quelques cas particuliers, leur structure est similaire à celle des récepteurs dont les ligands ont été identifiés. Deux explications ont été proposées : soit ils possèdent un ligand inconnu, soit ils n'ont effectivement pas de ligand.

1.1.1. Structure des récepteurs nucléaires

Les récepteurs nucléaires sont à la fois des récepteurs vis-à-vis de leur ligand (connu ou non) et des facteurs de transcription se liant à l'ADN. Ils portent donc tous des motifs structuraux responsables de cette dualité de fonction. Ils sont regroupés en une superfamille. En effet, la comparaison des régions homologues des récepteurs nucléaires révèle des homologies avec celles des récepteurs de la drosophile, indiquant qu'ils sont tous dérivés d'un gène ancestral connu (Laudet *et al.*, 1992). Les récepteurs nucléaires ont une structure modulaire caractéristique (Gronemeyer et Laudet, 1995; Giguere, 1999), composée de 4 domaines principaux qui portent chacun une ou plusieurs fonctions (voir figure 1): une région NH2-terminale variable (A/B), un domaine de fixation à l'ADN (C), une région charnière (D), et un domaine de fixation pour un ligand (E). Il existe dans certains récepteurs un cinquième domaine (F) en région C-terminale dont la fonction est peu connue.

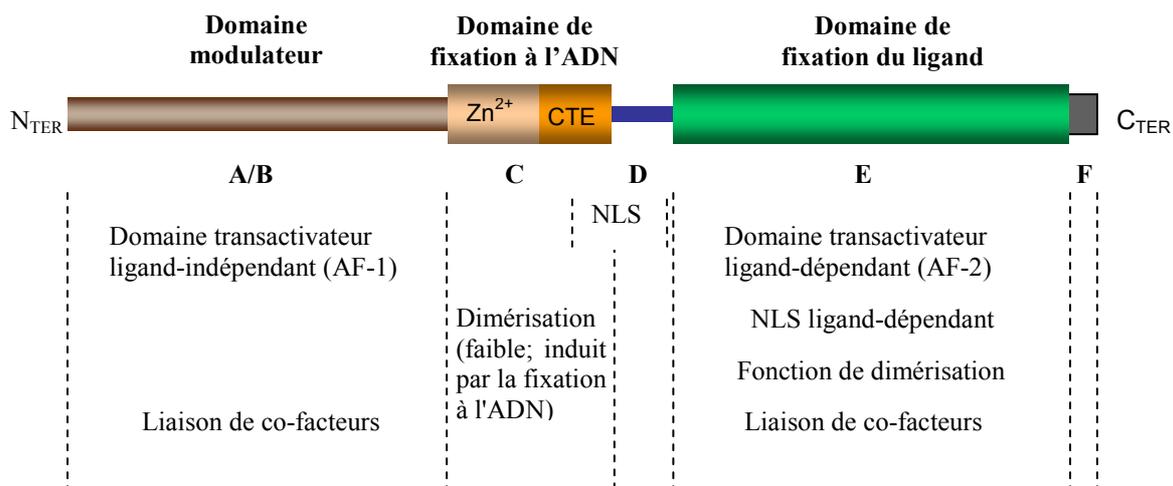


Figure 1: Représentation schématique des relations structure/fonction des récepteurs nucléaires. Les 5 modules des récepteurs nucléaires sont représentés avec leurs fonctions majeures. D'après Gronemeyer et Laudet, 1995; Robinson-Rechavi *et al.*, 2003.

- **Le domaine A/B ou domaine modulateur**, situé à l'extrémité amino-terminale, fait l'objet de la plus grande variabilité en terme de longueur (de 50 à 500 acides aminés) et de structure primaire.

La séquence de ce domaine est classiquement la séquence qui diffère entre les isoformes d'un récepteur nucléaire, générées par épissage alternatif d'un même gène. Ce domaine porte la fonction AF-1 (*Activation Function 1*) de transactivation indépendante de la fixation du

ligand, qui confère une activité de type promoteur et cellule-spécifique. Ceci suggère que ce domaine contribue à la spécificité d'action de chaque isoforme.

- **Le domaine C ou domaine de liaison à l'ADN (DBD/DNA Binding Domain)** est le domaine le mieux conservé au sein de la superfamille des récepteurs nucléaires.

Cette conservation s'explique par son rôle essentiel dans la reconnaissance et la liaison à l'ADN. Il est codé par environ 66 acides aminés et peut être subdivisé en deux régions fonctionnelles (voir figure 2). La première est un domaine composé de deux modules en doigt de zinc qui participe à la fois à la reconnaissance spécifique du motif consensus et au processus de dimérisation des récepteurs lorsqu'ils sont liés à l'ADN (Freedman, 1992). La deuxième, qui constitue une extension carboxy-terminale (CTE/Carboxy-Terminal Extension) composée d'environ 25 acides aminés, est impliquée dans la reconnaissance de courtes séquences d'ADN entourant le motif consensus, ce qui augmente la spécificité de reconnaissance de l'une ou l'autre des isoformes (Ueda *et al.*, 1992; Wilson *et al.*, 1992; Wilson *et al.*, 1993; Giguere *et al.*, 1995a; McBroom *et al.*, 1995).

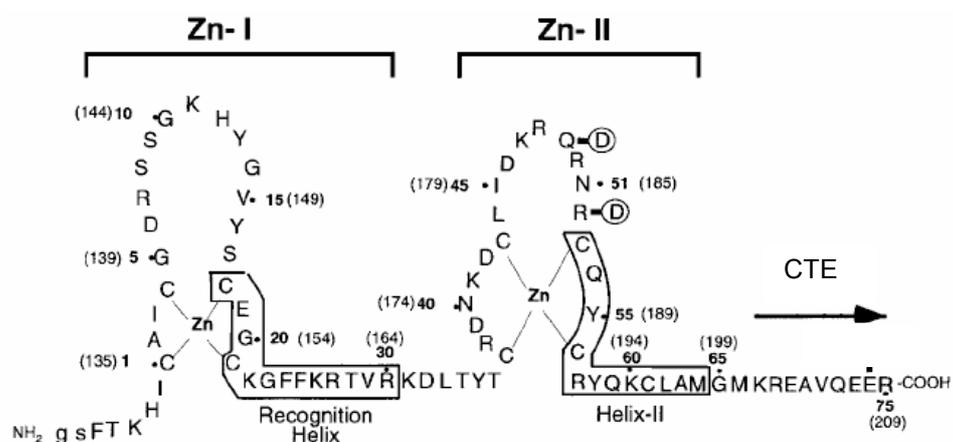


Figure 2: Représentation du DBD. La structure en doigts de zinc du domaine de liaison à l'ADN de ROR α est prise comme exemple, les séquences organisées en hélice α sont encadrées. D'après Zhao *et al.*, 1998.

- **Le domaine D ou région charnière** est assez peu conservé et de taille variable. Comme son nom l'indique, il constitue une région charnière flexible entre le DBD et le LBD et permet la rotation du DBD. En effet, la surface de dimérisation du LBD reste la même, et ce, quelle que soit la configuration de l'élément de réponse hormonale. Ce mécanisme implique donc que le DBD puisse tourner sur lui-même afin de faciliter la fixation aux

éléments de réponse (Rastinejad *et al.*, 1995). Ainsi, la flexibilité de la région charnière permet la rotation du DBD afin de faciliter la liaison des récepteurs qui peuvent se fixer à l'ADN à la fois en configuration direct et inversée (cas du ERR; Glass, 1994). Le domaine D porte généralement un signal de localisation nucléaire (NLS/*Nuclear Localisation Signal*), et permet l'interaction avec des co-répresseurs (Chen et Evans, 1995; Horlein *et al.*, 1995).

- **Le domaine E ou domaine de liaison au ligand (LBD/*Ligand Binding Domain*)** est le plus long domaine. Ce domaine multifonctionnel contient la poche de fixation du ligand, participe aux fonctions d'homo- ou d'hétérodimérisation et interagit avec les protéines de choc thermique, de localisation nucléaire (*via* un NLS) et de transactivation.

Le LBD est modérément conservé en ce qui concerne sa séquence en acides aminés, mais les 11 à 13 hélices α qui structurent le LBD se retrouvent chez la majorité des récepteurs nucléaires. La structure cristalline tridimensionnelle du LBD a été résolue pour plusieurs récepteurs nucléaires, permettant une meilleure compréhension des mécanismes de reconnaissance ligand/récepteur (Egea *et al.*, 2000a, b). Ainsi, on sait que les hélices α du récepteur constituent une structure tertiaire compacte permettant la création d'une poche hydrophobe dans laquelle le ligand pourra se placer (voir figure 3).

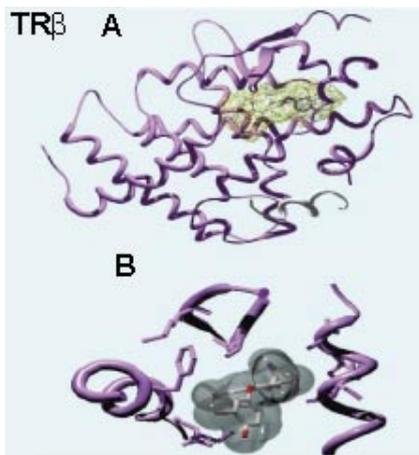


Figure 3: Représentation du LBD du récepteur thyroïdien TR β . A: Représentation des hélices α et du feuillet β du récepteur. Le ligand (T₃) est représenté en doré dans le LBD. B: Représentation de la poche de fixation du ligand en présence du ligand en gris. Seuls les résidus interagissant avec le ligand sont représentés. *D'après Harris et al., 2002.*

L'extrémité carboxy-terminale du LBD (hélice H12) contient un motif très conservé pour la fonction AF-2 (*Activation Function 2*) de transactivation dépendante du ligand. Ainsi divers co-facteurs (co-activateurs ou co-répresseurs) sont recrutés par cette région en présence (co-activateurs) ou en absence (co-répresseurs) du ligand et permettent la connexion du récepteur à la machinerie transcriptionnelle pour l'activer ou le réprimer. Enfin, le LBD possède une interface de dimérisation forte qui fait intervenir plusieurs hélices α .

- Certains récepteurs ont un petit **domaine carboxy-terminal supplémentaire (domaine F)**. Ce domaine est très peu conservé et sa structure comme ses fonctions restent mal définies à ce jour. Sa présence peut néanmoins jouer un rôle inhibiteur sur les capacités de transactivation du récepteur (Sladek *et al.*, 1999).

1.1.2. Classification des récepteurs nucléaires

Si la famille des récepteurs nucléaires se limitait à l'origine aux récepteurs des hormones stéroïdiennes, elle s'est rapidement agrandie, avec l'identification de nombreuses protéines sur la base de leur séquence (Gronemeyer et Laudet, 1995). Ainsi, l'identification du récepteur de l'ecdysone en tant que récepteur nucléaire au début des années 1990 (Koelle *et al.*, 1991) a bouleversé la vision des récepteurs nucléaires en suggérant leur universalité au sein du règne animal et en démontrant une origine antérieure à la divergence entre les vertébrés et les invertébrés.

Aujourd'hui, les récepteurs nucléaires forment une superfamille de protéines classées selon les bases d'analyses phylogénétiques (figure 4). La première d'entre elles a été réalisée par V. Laudet en 1992 qui a élaboré un arbre phylogénétique en comparant les séquences en acides aminés des domaines C, D et E (Laudet *et al.*, 1992). Cette classification des récepteurs nucléaires, remaniée plusieurs fois depuis 1992 (Robinson-Rechavi *et al.*, 2003), démontre clairement une origine ancestrale commune à l'ensemble des récepteurs nucléaires. L'adoption d'une nomenclature unifiée en 1999 à l'occasion du "Nuclear Receptors Nomenclature Committee" a permis d'organiser la diversité des récepteurs nucléaires (Nuclear Receptors Nomenclature Committee, 1999). Cette nomenclature se présente sous la forme NR_{XYZ}, où X représente la sous-famille, Y le groupe et Z le gène. Jusqu'à présent, il a été identifié une vingtaine de gènes codant des récepteurs nucléaires chez la drosophile, une cinquantaine chez l'Homme et la souris et, de manière inattendue, plus de 270 chez le nématode (Robinson-Rechavi *et al.*, 2003).

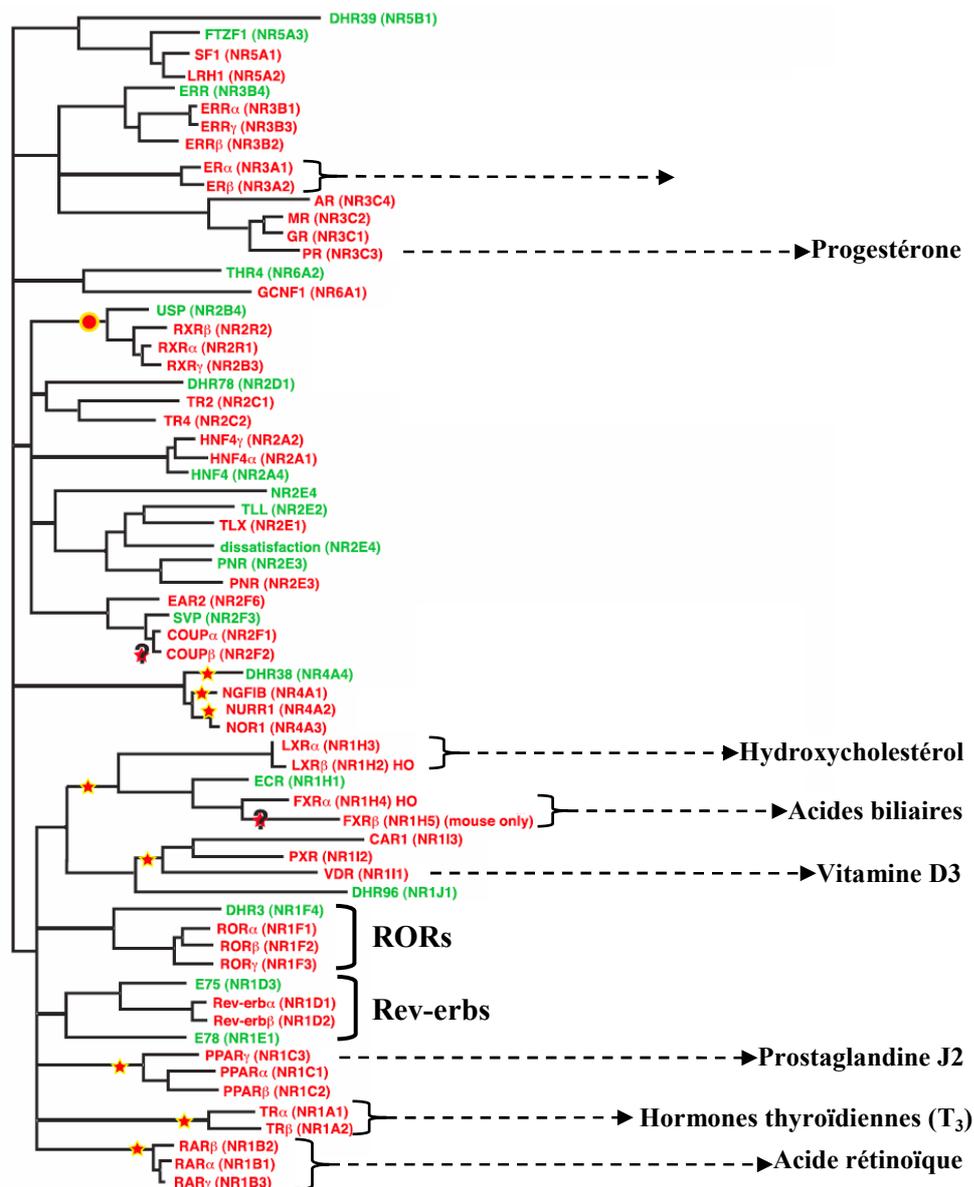


Figure 4: Arbre phylogénétique des membres de la superfamille des récepteurs nucléaires.

Cet arbre phylogénétique a été établi par comparaison des séquences en acides aminés des domaines C, D et E des récepteurs nucléaires. La longueur des branches est proportionnelle à la divergence entre ces séquences. Les récepteurs nucléaires de mammifères (caractères rouges) et d'arthropodes (caractères verts) sont représentés. Les RXRs (*Retinoid X Receptors*), principaux partenaires d'hétérodimérisation, sont mis en évidence par un point rouge. Des étoiles rouges indiquent les partenaires d'hétérodimérisation des RXRs. Les points d'interrogation marquent une incertitude quant à la dimérisation COUP-TF/RXR et le manque d'information au sujet de FXR β . D'après Robinson-Rechavi et al., 2003.

1.1.3. Liaison des récepteurs nucléaires à l'ADN

Les récepteurs nucléaires, en qualité de facteur de transcription, se lient à l'ADN pour contrôler la transcription.

Les facteurs de transcription interagissent avec la machinerie générale de la transcription au niveau de la chromatine dans la région promotrice d'un gène. Ces facteurs de transcription se fixent au niveau de séquences spécifiques de l'ADN.

1.1.3.1. Organisation générale des promoteurs et machinerie transcriptionnelle.

Nous nous intéresserons ici seulement aux gènes codant des protéines (les transcrits sont alors de ARN messagers, ARNm); en effet, les gènes codant les ARN ribosomiaux (ARNr) et de transfert (ARNt) impliquent des mécanismes et des facteurs différents.

La plupart des gènes codant pour des ARNm sont constitués de deux séquences d'ADN distinctes : la séquence transcrite et la séquence régulatrice (figure 5). La séquence transcrite est composée d'exons et d'introns, et sera éventuellement traduite pour produire une chaîne polypeptidique fonctionnelle. La séquence régulatrice, également appelée région promotrice ou promoteur, est généralement située en amont de la séquence transcrite et contrôle la production du message.

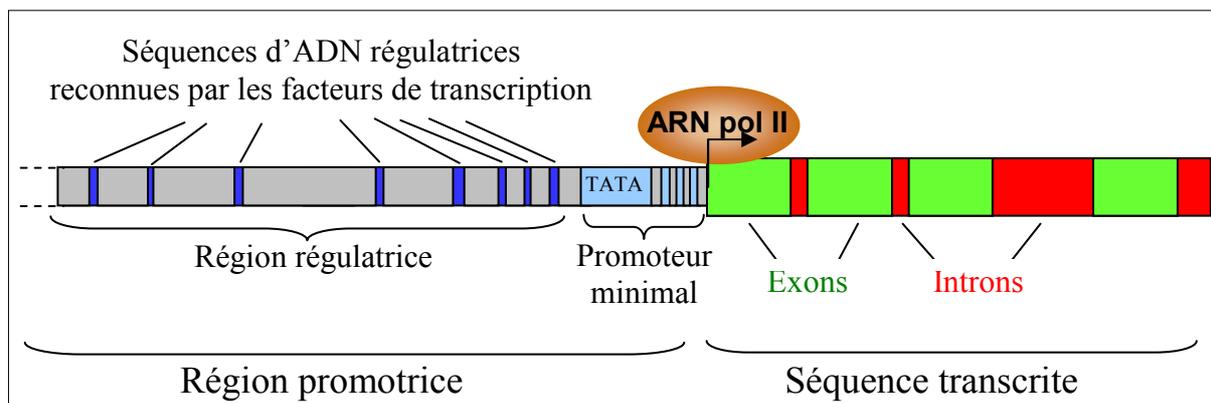


Figure 5: Représentation schématique d'un promoteur d'un gène codant pour un ARNm.

Chez les eucaryotes, c'est l'ARN polymérase II (ARN pol II) qui est responsable de la transcription des gènes, mais elle ne peut déclencher l'initiation de l'ARNm qu'en présence d'un minimum de protéines additionnelles appelées facteurs généraux de transcription (TF/

Transcription Factor), tels que les TFII-A, -B, -D, -E, -F et -H. L'ARN pol II et les facteurs généraux de transcription constituent le complexe de pré-initiation (Roeder, 1996).

Le promoteur contient deux zones : le promoteur minimal et la région régulatrice. Le promoteur minimal (Butler et Kadonaga, 2002) est composé de 50 nucléotides adjacents au site d'initiation de la transcription, et reconnu par les facteurs généraux d'initiation de la transcription. Les éléments du promoteur minimal sont de plusieurs types et chaque promoteur est constitué d'un ou de plusieurs d'entre eux (voir figure 6).

La boîte TATA (consensus TATAa/tAa/t) est la séquence la plus communément présente. Elle permet la fixation de la protéine TBP (TATA box Binding Protein) qui est une sous-unité du facteur TFII-D. Le promoteur minimal ne possède, chez les eucaryotes, qu'une activité transcriptionnelle faible ou nulle.

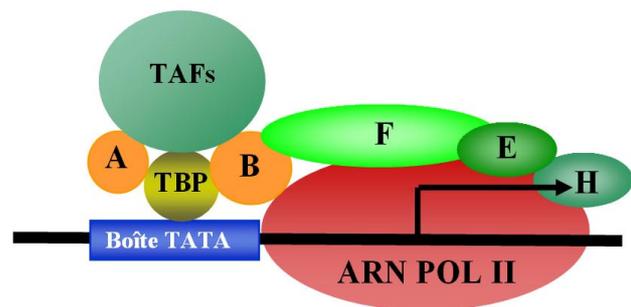


Figure 6: Promoteur minimal et fixation de la machinerie transcriptionnelle chez les eucaryotes. (TBP/*TATA binding protein*, TAF/*TBP Associated Factor*)

La deuxième zone du promoteur, la région régulatrice, est composée de séquences d'ADN en position proximale (quelques centaines de paires de bases en amont du site d'initiation de la transcription) ou distale (jusqu'à plusieurs milliers de paires de bases en amont ou en aval du promoteur minimal). Ainsi, la taille d'un promoteur peut varier de quelques centaines de bases à plusieurs kilobases. La région régulatrice est constituée par le regroupement de plusieurs sites de liaison à l'ADN, appelés éléments *-cis*, pour des facteurs de transcription qui modulent la transcription en contrôlant la fonction des facteurs généraux de transcription.

Les éléments *-cis* sont classés en deux types: d'une part les *enhancers* qui contiennent des sites de liaison à l'ADN pour des facteurs conduisant à une augmentation de l'activité transcriptionnelle basale et, d'autre part, les *silencers* qui jouent le rôle inverse. Chaque facteur de transcription reconnaît un enchaînement de nucléotides qui lui est propre (élément de réponse). De plus, plusieurs facteurs de transcription peuvent entrer en compétition pour la liaison d'une séquence ou, au contraire, coopérer pour se lier à un élément *-cis* donné.

1.1.3.2. Mode d'action des récepteurs nucléaires et éléments de réponse.

De façon générale, le mécanisme d'action des récepteurs nucléaires est le même pour tous les membres de la superfamille (figure 7).

Les ligands peuvent être extracellulaires, intracellulaires, voire même synthétisés *de novo* par la cellule. Ce dernier mode d'action constitue probablement une raison majeure pour laquelle plusieurs récepteurs orphelins n'ont pu être identifiés lors d'études endocrinologiques classiques.

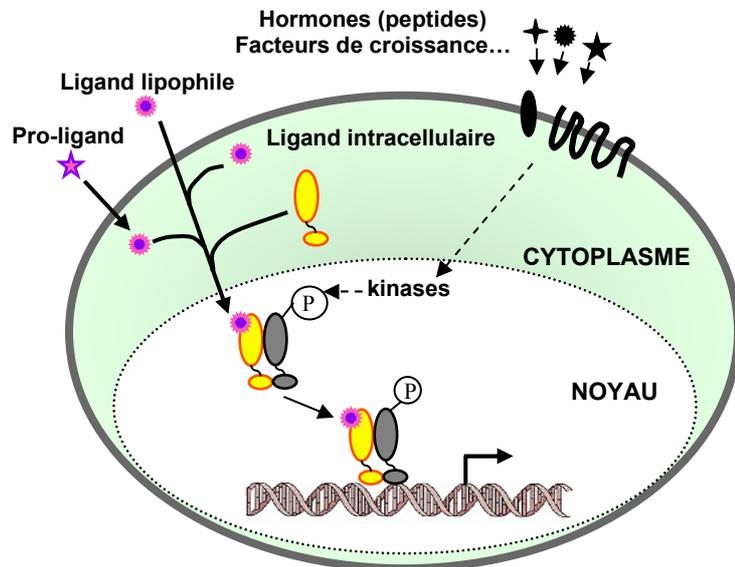


Figure 7: Mode d'action des complexes ligand-récepteur.

Une fois formés, les complexes ligand-récepteur agissent comme régulateurs de l'expression génique.

Les récepteurs nucléaires régulent la transcription en se fixant sur de courtes séquences d'ADN situées dans les régions régulatrices des gènes cibles et connues sous le nom d'éléments de réponse hormonale (HRE, *H*ormone *R*esponse *E*lement). Ceux-ci sont situés dans les séquences régulatrices généralement localisées dans la région 5' du gène cible. Une classification réalisée en 1995 a permis de définir des grandes classes de récepteurs nucléaires sur la base de leurs caractéristiques de dimérisation et de liaison à l'ADN (Mangelsdorf *et al.*, 1995).

Un récepteur nucléaire peut lier l'ADN sous forme de monomère, d'homodimère, ou en entrant dans la formation d'un hétérodimère (voir figure 8). RXR (*R*etinoid *X* *R*eceptor) est le principal médiateur d'hétérodimérisation des récepteurs nucléaires (Mangelsdorf et Evans, 1995). Les complexes dimériques peuvent interagir avec des répétitions directes (DR/*D*irect *R*epeat), éversées (ER/*E*verted *R*epeat) ou inversées (IR/*I*nverted *R*epeat) d'un demi-site a/gGGTCA ou AGAACA (dans le cas des hormones stéroïdiennes), classiquement séparés par 0 à 7 nucléotides. La spécificité de liaison de chaque dimère à l'ADN est dictée à la fois par la configuration prise par les deux demi-sites et par le nombre de nucléotides séparant

chaque demi-site (figure 8). Les récepteurs monomériques se lient sur des variations d'un demi-site a/gGGTCA. Ainsi, une très grande diversité de HREs peut être générée en utilisant un seul demi-site qui est commun à presque tous les récepteurs nucléaires. Du côté des récepteurs nucléaires, la spécificité de liaison est déterminée par le domaine en doigt de zinc lui-même, mais aussi par l'extension carboxy-terminale et l'extrémité amino-terminale du DBD. Une fois liés à l'ADN, les récepteurs nucléaires peuvent moduler de façon positive ou négative l'expression des gènes cibles.

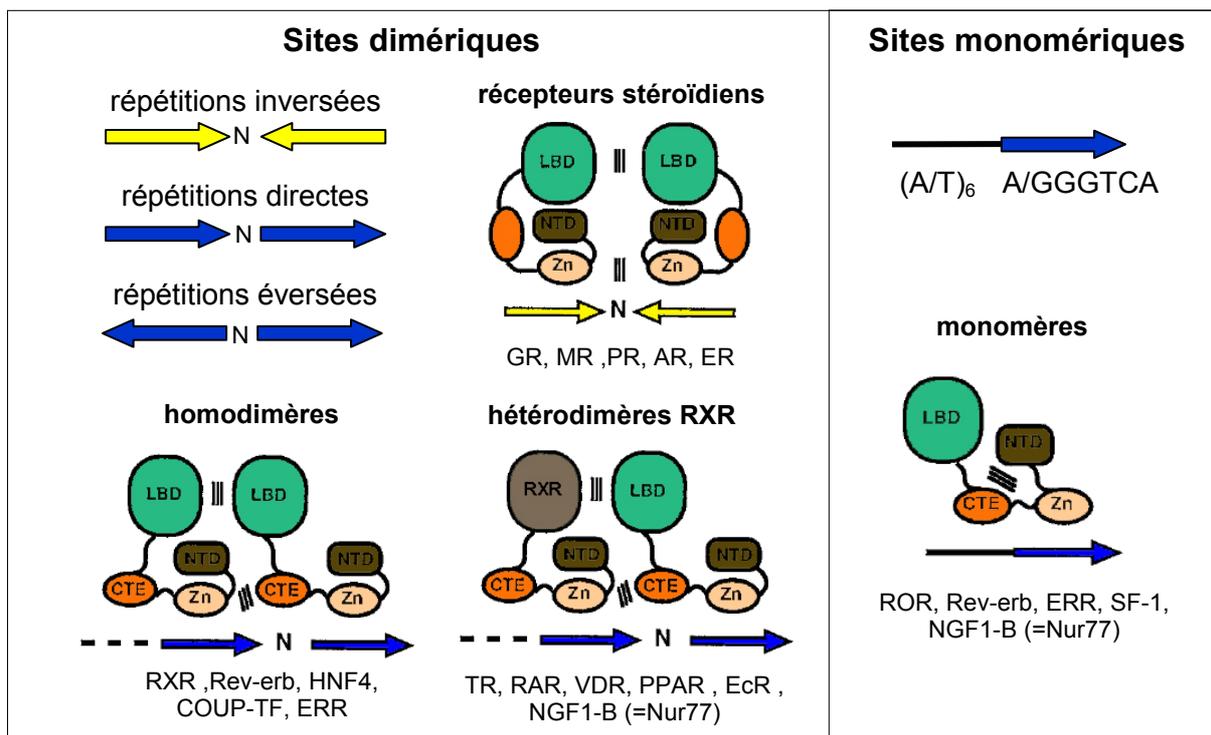


Figure 8: Modes de liaison des récepteurs nucléaires à l'ADN.

Les récepteurs nucléaires peuvent se lier à l'ADN sous forme d'homodimères, d'hétérodimères avec RXR ou de monomères. Les sites de liaison des récepteurs nucléaires (ou HREs, *Hormone Response Elements*) non stéroïdiens sont composés d'un motif (généralement A/GGGTCA) précédé en 5' par une séquence riche en A/T pour les récepteurs monomériques, ou de deux motifs A/GGGTCA pour les récepteurs dimériques (flèches bleues). Les motifs des sites dimériques peuvent être arrangés selon une topologie inversée, directe ou éversée. Les HREs des récepteurs nucléaires stéroïdiens sont des répétitions inversées du motif AGAACA (flèches jaunes). Le nombre (N) de nucléotides qui sépare les deux motifs (de type A/GGGTCA ou de type AGAACA) est variable. Des exemples de récepteurs nucléaires sont donnés pour chacune des 4 catégories (récepteurs stéroïdiens, hétérodimères RXR, homodimères, monomères). D'après Mangelsdorf et Evans, 1995; Giguere, 1999.

1.1.3.3. Chromatine et modulation de la liaison des récepteurs nucléaires à l'ADN.

Le contexte du promoteur est un élément majeur du contrôle de la liaison des récepteurs nucléaires à l'ADN. L'ADN est organisé sous forme de chromosomes qui sont constitués d'une structure nucléoprotéique compacte : la chromatine. La structure chromatinienne joue un rôle prépondérant dans la liaison des récepteurs nucléaires à l'ADN, permettant, ou non, l'accès d'un facteur de transcription à un élément *-cis* donné. Seule 10% de la chromatine est dite "active", c'est à dire impliquée dans la transcription (euchromatine). Tous les phénomènes modulant la structure chromatinienne sont donc impliqués dans la régulation de la liaison des facteurs de transcription à l'ADN et, par conséquent, dans le contrôle de la transcription. Ainsi, l'acétylation et la déacétylation des histones, qui modifient la charge électrostatique globale du nucléosome, participent de façon indirecte à la liaison des récepteurs nucléaires à l'ADN. L'hyperacétylation des histones a été corrélée à une augmentation de l'activité transcriptionnelle, alors que l'hypoacétylation des histones a été décrite dans des régions transcriptionnellement inactives. Le taux d'acétylation des histones est sous le contrôle de deux types de protéines : les protéines à activité histone acétyltransférase (HAT) qui transfèrent le groupement acétyle, et les protéines à activité histone déacétylase (HDAC) qui le retirent. Comme nous allons le voir dans le paragraphe suivant, les récepteurs nucléaires participent eux-mêmes aux phénomènes d'acétylation et de déacétylation des histones.

1.1.4. Modulation de l'activité transcriptionnelle par les récepteurs nucléaires.

Si la liaison des récepteurs nucléaires à l'ADN est une étape importante et finement contrôlée de leur mode d'action, elle n'est pas la seule. En effet, les récepteurs nucléaires doivent ensuite pouvoir moduler l'activité transcriptionnelle basale pour jouer pleinement leur rôle de facteurs de transcription.

Les facteurs de transcription peuvent moduler l'activité transcriptionnelle soit directement en agissant avec les facteurs généraux de transcription, soit indirectement en faisant intervenir des facteurs intermédiaires, chargés de faire le lien avec les facteurs généraux (voir figure 9). Ce sont les co-facteurs, co-activateurs et co-répresseurs (Collingwood *et al.*, 1999; Glass et Rosenfeld, 2000; Robyr *et al.*, 2000). Par exemple, les co-

activateurs de la famille TRAP (*Thyroid hormone Receptor Associated Proteins*), DRIP (*Vitamin D₃ Receptor Interacting Protein*) et p300/CBP (*p300/CREB-Binding Protein*) sont recrutés par les récepteurs nucléaires et contactent la machinerie transcriptionnelle basale. D'autre part, il existe un grand nombre de co-facteurs qui modulent l'accessibilité de la chromatine en agissant sur les nucléosomes. Une activité HAT a été mise en évidence pour de nombreux co-activateurs tels que p300/CBP, p/CAF (*p300/CBP-Associated Factor*) et de protéines de la famille SRC (*Steroid Receptor Coactivator*) comme SRC-1 et RAC-3. Contrairement aux HAT, aucun co-facteur identifié à ce jour ne présente d'activité HDAC. Dans la majorité des cas, les protéines à activité HDAC sont recrutées sur les promoteurs sous forme de complexes. Par exemple, les co-répresseurs N-CoR (*Nuclear receptor CoRepressor*) et SMRT (*Silencing Mediator of Retinoic acid and Thyroid hormone receptors*) font partie d'un complexe contenant la protéine SIN3, intermédiaire permettant le recrutement de protéines à activité HDAC.

C'est la coordination de tous ces facteurs dans une cellule donnée à un instant donné, ainsi que l'accessibilité du promoteur, qui permettent l'expression ou la répression d'un gène. Schématiquement, les récepteurs nucléaires agissent en trois étapes : répression, dérèpression et activation de la transcription (Mangelsdorf et Evans, 1995; Robinson-Rechavi *et al.*, 2003).

- 1- **La répression** est caractéristique du récepteur sous forme « apo » (non lié au ligand), qui recrute un complexe co-répresseur avec une activité HDAC. La liaison du récepteur sous forme « apo » a été montrée pour RAR (*Retinoic Acid Receptor*) et pour le récepteur à l'hormone thyroïdienne (TR/*Thyroid hormone Receptor*).
- 2- **La dérèpression** a lieu à la suite de la liaison du ligand, qui provoque la dissociation du complexe co-répresseur et le recrutement d'un complexe co-activateur avec une activité HAT. En effet, la liaison du ligand provoque un changement conformationnel qui conduit à l'exposition à la surface du récepteur des interfaces de liaison des co-activateurs, notamment de l'hélice H12 (contenant le domaine AF-2). Le recrutement du complexe co-activateur avec une activité HAT conduit à la décondensation de la chromatine, nécessaire mais insuffisante à l'activité des gènes cibles.
- 3- Dans la troisième étape, l'étape d'**activation**, le complexe HAT se dissocie et un second complexe co-activateur est recruté (exemples : TRAP, DRIP). Ce dernier

contacte la machinerie basale de transcription, ce qui conduit à l'activation de la transcription des gènes cibles.

L'ordre de ces événements est encore débattu. De plus, le mécanisme décrit n'est pas général et ne rend pas compte de la diversité des modes d'action des récepteurs nucléaires.

En effet, dans le cas des récepteurs aux stéroïdes, le récepteur sous forme "apo" n'est pas lié à l'ADN. La modification conformationnelle induite par la reconnaissance du ligand favorise la dimérisation du récepteur ainsi que sa liaison à l'ADN en exposant à sa surface les interfaces de liaison nécessaires. Par exemple, en l'absence de ligand, le récepteur aux glucocorticoïdes (*GR/Glucocorticoid Receptor*) est séquestré dans le cytoplasme par des protéines de choc thermique (Pratt, 1993). La liaison du ligand au LBD du GR entraîne alors la dissociation de ce complexe, conduisant à une modification conformationnelle, à la translocation du GR dans le noyau et à la liaison du récepteur à l'ADN. Par ailleurs, certains récepteurs comme COUP-TF1 (*Chicken Ovalbumin Upstream Promoter-Transcription Factor 1*) ne semblent pas posséder de ligand. Il est vraisemblable que leur activation passe par des modifications post-traductionnelles et, en particulier, par des phosphorylations du récepteur.

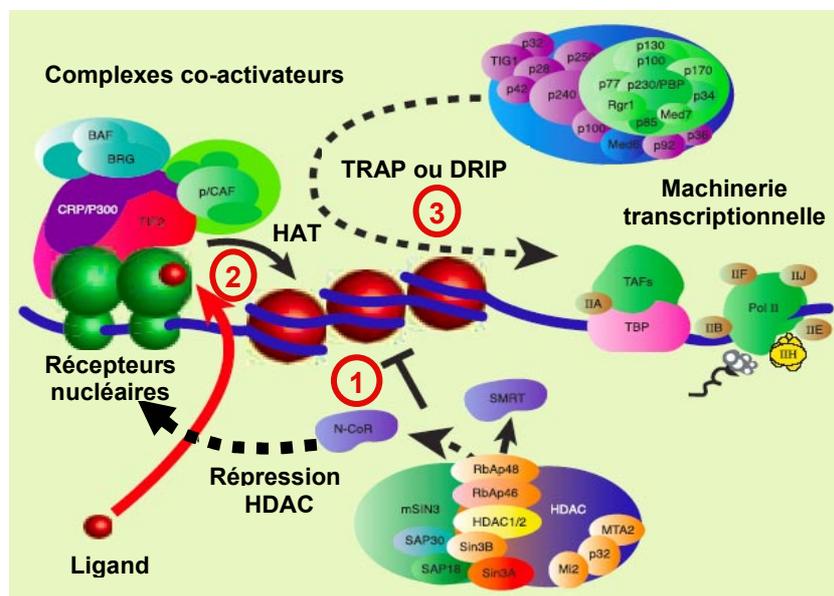


Figure 9: Représentation schématique du mode d'action des récepteurs nucléaires.

(1) En l'absence de ligand, le récepteur nucléaire recrute un complexe co-répresseur à activité HDAC qui contribue à la condensation de la chromatine. (2) La liaison du ligand à son récepteur provoque le désengagement du complexe co-répresseur et le recrutement d'un complexe co-activateur à activité HAT qui décondense la chromatine. (3) Un autre complexe co-activateur recruté par le récepteur nucléaire stimule l'initiation de la transcription en interagissant avec la machinerie transcriptionnelle. *D'après Robinson-Rechavi et al., 2003.*

1.1.5. La famille des récepteurs orphelins

Les membres "classiques" de la superfamille des récepteurs nucléaires ont été découverts et clonés grâce à la connaissance que l'on avait de leurs ligands. En effet, il était établi que certaines hormones connues exerçaient leurs fonctions physiologiques grâce à leur liaison à des récepteurs (Evans, 1988). Les chercheurs ont alors noté que les récepteurs nucléaires présentaient une très grande homologie de séquence, à la fois au niveau protéique et nucléotidique. De nouveaux membres ont ensuite été cherchés, non plus à partir de la connaissance d'une hormone, mais directement dans les banques d'ADNc, en utilisant comme sonde les séquences du DBD, le domaine le plus conservé. Cet exercice de clonage a conduit à 2 résultats inattendus. Premièrement, un même ligand, comme T₃ et l'acide rétinoïque tout-trans, peut se fixer à de multiples récepteurs. Deuxièmement, la recherche de nouveaux membres de la superfamille a conduit à l'isolement de nombreux ADNc codant pour des protéines présentant des structures caractéristiques des récepteurs nucléaires, mais dont le ligand est encore inconnu ou inexistant. Ces protéines (dont ROR α) ont alors été regroupées sous le terme de "récepteurs nucléaires orphelins".

Les récepteurs nucléaires orphelins reconnaissent des éléments de réponse spécifiques grâce à leur DBD de façon similaire à celle des récepteurs nucléaires classiques. En effet, la majorité des récepteurs nucléaires orphelins possèdent tous les domaines fonctionnels qui caractérisent les récepteurs nucléaires classiques (Zhao *et al.*, 1998). Cependant certains récepteurs ont un domaine régulateur très court, et par conséquent ne possèdent pas de domaine AF-1. D'autres, comme Rev-Erb, ne possèdent pas de domaine AF-2.

I.2. Le groupe des récepteurs ROR α , β , γ

La sous-famille des récepteurs ROR (*Retinoic acid receptor related Orphan Receptor α*), initialement dénommés RZR (*Retinoic Z Receptors*), est composée de trois isotypes: ROR α , ROR β et ROR γ (pour revues, voir Jetten *et al.*, 2001; Jetten, 2004), respectivement nommés NR1F-1, -2, et -3 par le Comité de Nomenclature de Récepteurs Nucléaires (Nuclear Receptors Nomenclature Committee, 1999). Chacun des trois membres de la famille ROR présente un profil d'expression qui lui est propre, suggérant que chacun d'entre eux régule des processus physiologiques différents de ceux régulés par les autres membres.

Les gènes *DHR3* (Koelle *et al.*, 1992), *MHR3* (Palli *et al.*, 1992) et *CHR3* (Kostrouch *et al.*, 1995) ont été identifiés chez *Drosophila melanogaster*, *Manduca sexta* et *Caenorhabditis elegans*, respectivement. La comparaison de leur séquence avec celle des RAR/RORs de mammifères indique que ces gènes sont des homologues d'insectes des RAR/RORs (Koelle *et al.*, 1992; Palli *et al.*, 1992; Becker-Andre *et al.*, 1993). Chez le nématode, *CHR3* semble intervenir dans le développement de l'épiderme et la mue alors que *DHR3* semble nécessaire dans la transition prépupale-pupale, dans le développement du système nerveux périphérique et dans la différenciation de structures adultes pendant la métamorphose chez la drosophile (Carney *et al.*, 1997).

1.2.1. Clonage des RORs

La découverte des récepteurs ROR est le fruit de différentes stratégies mises en œuvre afin de cloner de nouveaux membres de la superfamille des récepteurs nucléaires. Ces stratégies sont fondées sur l'homologie de séquence que présentent les récepteurs nucléaires au niveau des deux doigts de zinc du DBD.

Le récepteur ROR α humain (hROR α) a été le premier de la famille ROR cloné à partir de cellules endothéliales de veine ombilicale humaine (ou HUVECs pour *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*; Becker-Andre *et al.*, 1993). Le séquençage de ce nouveau récepteur, initialement nommé RZR α (où "Z" désigne une nouvelle famille), indique qu'il présente de fortes homologies de séquence avec les récepteurs à l'acide rétinoïque RAR (*Retinoic Acid-Receptor*) et RXR (*Retinoid X Receptor*). RZR α sera donc rapidement renommé ROR α (*RAR-related Orphan Receptor α*). De nombreux ADNc codant pour

diverses isoformes de hROR α ont été isolés après criblage de banques d'ADNc humains de rétine et de testicule (Giguere *et al.*, 1994). Quatre isoformes de ROR α (ROR α 1, ROR α 2, ROR α 3, RZR α / ROR α 4) ont été identifiées (Giguere *et al.*, 1994; Matysiak-Scholze et Nehls, 1997; Steinmayr *et al.*, 1998).

ROR β a été cloné à partir de cerveau de rat grâce à une stratégie de PCR similaire à celle qui a permis le clonage de ROR α (Carlberg *et al.*, 1994). Deux isoformes de ROR β (ROR β 1 et ROR β 2) ont été identifiées (Andre *et al.*, 1998a).

hROR γ a aussi été cloné par PCR à partir de pancréas humain (Hirose *et al.*, 1994). Le récepteur mROR γ , aussi appelé TOR (*Thymus Orphan Receptor*), a été cloné après criblage de banques d'ADNc de muscle (Medvedev *et al.*, 1996) et de cellules T de souris (Ortiz *et al.*, 1995). Deux isoformes ROR γ 1 et ROR γ 2 (aussi nommé ROR γ t) ont été identifiées (He *et al.*, 1998).

1.2.2. Structure des protéines ROR

Les protéines ROR ont une structure en domaines similaire aux autres membres de la superfamille des récepteurs nucléaires (voir figure 1). Elles contiennent un domaine modulateur (région A/B), un domaine de liaison à l'ADN (région C), une région charnière (région D) et un domaine de liaison au ligand (région E) en position carboxy-terminale (Becker-Andre *et al.*, 1993; Carlberg *et al.*, 1994; Giguere *et al.*, 1994; Hirose *et al.*, 1994; Ortiz *et al.*, 1995; Medvedev *et al.*, 1996). Les isoformes codées par chacun des trois gènes *Rora*, *Rorb* ou *Rorg* diffèrent entre elles seulement par la séquence de leur domaine amino-terminal (voir figure 10), leurs domaines de liaison à l'ADN et au ligand étant identiques (Giguere *et al.*, 1994; Andre *et al.*, 1998a; He *et al.*, 1998; Villey *et al.*, 1999). Les isoformes sont générées par épissage alternatif et par usage de promoteur alternatif. Le domaine amino-terminal est impliqué dans la spécificité de liaison des RORs à l'ADN, comme cela a été montré pour ROR α (Giguere *et al.*, 1994).

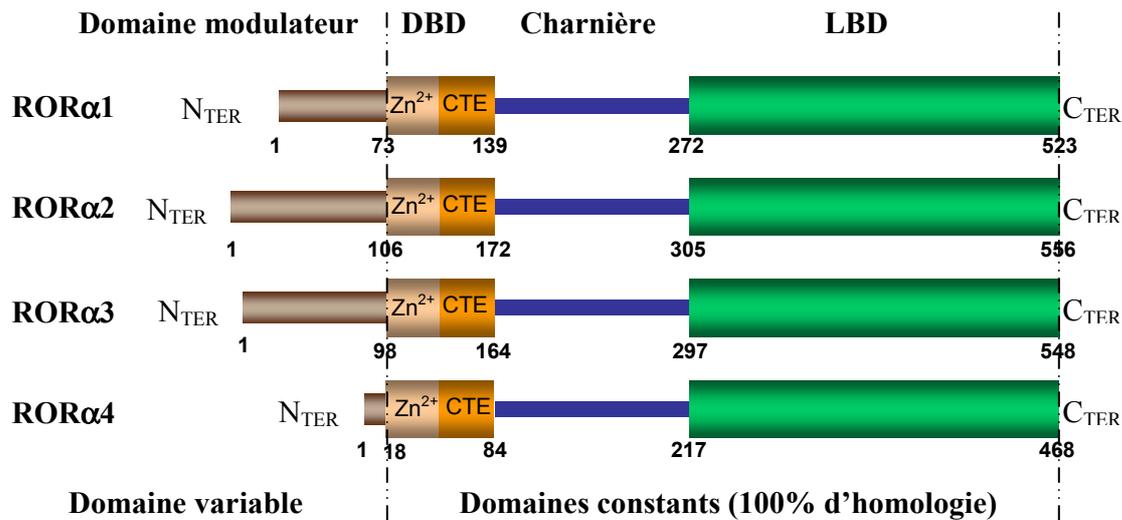


Figure 10: Comparaison de la structure modulaire des isoformes de ROR α chez l'Homme. Les séquences en acides aminés ont été alignées schématiquement en respectant la structure modulaire des récepteurs. Les chiffres indiquent la position des domaines fonctionnels par rapport à la séquence en acides aminés. (Zn²⁺, doigts de zinc; CTE, extension carboxy-terminale)

La comparaison de la séquence en acides aminés de ROR α 1, ROR β 1 et ROR γ 1 montre que le domaine le plus conservé entre les RORs est le domaine de liaison à l'ADN. Les DBDs de ROR β , ROR γ et DHR3 sont respectivement 91%, 88% et 77% identiques à celui de ROR α . Le DBD du récepteur RAR présente 67% d'identité avec le DBD des RORs, alors que les DBDs des autres récepteurs ont moins d'homologie avec ceux des RORs. Dans le DBD, l'extension carboxy-terminale (CTE) est particulièrement conservée entre les RORs.

L'extension carboxy-terminale joue un rôle important dans l'affinité de ROR α pour le RORE (*ROR-Response Element*; Giguere *et al.*, 1995a), comme nous en discuterons par la suite. La région charnière est très peu conservée entre les RORs, et les LBDs des RORs ne sont que modérément conservés. Les LBDs de ROR β et de ROR γ présentent respectivement 63% et 58% d'identité avec le LBD de ROR α .

Comme cela a été montré pour d'autres récepteurs nucléaires comme RXR α (Bourguet *et al.*, 1995), le LBD des RORs contient 12 hélices α (Harris *et al.*, 2002; Kallen *et al.*, 2002). Deux régions du LBD, l'une contenant les hélices 3, 4 et 5 et l'autre contenant l'hélice 12, sont particulièrement conservées entre les RORs. Les hélices 3, 4, 5 et 12 constituent une surface d'interaction pour les co-activateurs et les co-répresseurs. La séquence PPLYKELF située dans l'hélice 12 correspond au motif AF-2 (Danielian *et al.*, 1992).

Comme nous en discuterons (§1.3.2 et §1.3.3), le domaine AF-2 joue un rôle clé dans le contrôle de l'interaction des RORs avec les co-répresseurs et les co-activateurs et, par conséquent, dans le contrôle de l'activité des RORs.

1.2.3. Localisation chromosomique des gènes *Ror*

Le gène *Rora* est localisé sur le chromosome 15q21-q22 chez l'homme et sur le chromosome 9 chez la souris (Giguere *et al.*, 1995b; Hamilton *et al.*, 1996). Le gène *Rorb* est localisé sur le chromosome 9q22 humain, région sythénique avec le chromosome 4 de souris (Andre *et al.*, 1998b). Le gène *Rorg* est localisé sur le chromosome 1q21 chez l'homme et sur le chromosome 3 de souris (Medvedev *et al.*, 1996).

1.2.4. Profils d'expression des RORs

Les transcrits de *Rora* ont été détectés dans de nombreux tissus humains et murins dont le cœur, le cerveau, le foie, le testicule, l'ovaire, le poumon, le muscle squelettique, la rate, les leucocytes sanguins périphériques et la peau (Becker-Andre *et al.*, 1993; Steinmayr *et al.*, 1998). La plus grande quantité de transcrits a été retrouvée dans les leucocytes et la peau. Le transcrit prédominant dans la plupart des tissus a une taille approximative de 15kb. Quelques tissus, dont la rate, le foie, le testicule et les leucocytes, contiennent des transcrits additionnels dont les tailles sont de 7,5 et 2,3 kb. Trois transcrits (10,5 kb - 7,5 kb - 2,4 kb) ont aussi été détectés dans le cervelet de souris (Hamilton *et al.*, 1996). Ces transcrits pourraient être générés par l'utilisation alternative de signaux de polyadénylation.

Dans le cerveau, les transcrits *Rora* de souris sont préférentiellement localisés dans des régions spécifiques comme le thalamus, le bulbe olfactif, le noyau suprachiasmatique de l'hypothalamus, les cellules ganglionnaires de la rétine, les cellules de Purkinje et les interneurons du cervelet (Matsui *et al.*, 1995; Sashihara *et al.*, 1996; Steinmayr *et al.*, 1998).

Le transcrit *Rora1* est le seul détecté dans le thalamus, le transcrit *Rora4* est prédominant dans les leucocytes et la peau, les transcrits *Rora2* et *Rora3* sont spécifiquement détectés dans le testicule (Matysiak-Scholze et Nehls, 1997; Steinmayr *et al.*, 1998). La plupart des autres tissus contient un mélange des transcrits *Rora1* et *Rora4* (Steinmayr *et al.*, 1998). Le profil d'expression ubiquitaire du gène *Rora* suggère qu'il participe à différents processus physiologiques au sein de nombreux organes.

Le profil d'expression des transcrits *Rorb* est plus restreint que celui des transcrits *Rora*. Les transcrits *Rorb* sont préférentiellement localisés dans le cerveau, notamment dans la glande pinéale, la rétine et le noyau suprachiasmatique de l'hypothalamus (Becker-Andre *et al.*, 1994; Schaeren-Wiemers *et al.*, 1997).

Le gène *Rorg* génère deux transcrits: le transcrit *Rorg1* a été détecté dans de nombreux tissus et il est plus abondamment exprimé dans le thymus, le muscle squelettique, le foie, la glande mammaire, le rein et le tissu adipeux brun (Hirose *et al.*, 1994; Ortiz *et al.*, 1995; Medvedev *et al.*, 1996). L'expression du transcrit *Rorg2* est restreinte au thymus et elle est finement contrôlée au cours de la thymopoïèse (He *et al.*, 1998; Villey *et al.*, 1999; He *et al.*, 2000).

1.2.5. Fonctions des protéines ROR

Les sites de fixation reconnus par les RORs ont été identifiés dans les régions régulatrices de nombreux gènes (voir table I et §1.4 pour ROR α). Etant donné la diversité des fonctions physiologiques couvertes par les cibles potentielles des RORs, reconnaître leurs principales fonctions n'est pas aisé. Cependant, l'analyse des mutants spontanés ou des souris inactivées pour ces gènes ou encore les analyses en culture ont permis de démontrer les rôles multiples de ces récepteurs.

Les fonctions de ROR α sont variées et ont été décrites dans et hors du système nerveux (voir §1.5). ROR β semble être un important régulateur de la survie cellulaire dans le système nerveux central. Le phénotype associé avec la mutation du locus ROR β chez la souris inclut une ataxie juvénile, une démarche "en canard", des altérations de l'activité circadienne, une dégénérescence de la rétine et un retard de la fertilité mâle (Andre *et al.*, 1998b). Ce phénotype rappelle les anomalies observées chez *vacillans*, un mutant murin spontané décrit il y a près de 50 ans, et dont la lignée a aujourd'hui disparu (Sirlin, 1956). Bien que le phénotype de souris invalidées pour ROR γ n'ait pas encore été rapporté jusqu'à présent, des études cellulaires suggèrent que ROR γ pourrait jouer un rôle dans le développement des thymocytes (He *et al.*, 1998). ROR γ pourrait ainsi supprimer l'expression de Fas-Ligand et la sécrétion de l'interleukine-2 par les thymocytes immatures CD4⁺/CD8⁺ pendant le processus de sélection négative et positive qui a lieu dans le thymus.

1.2.6. Expression des protéines ROR au cours du rythme circadien

Les gènes de la famille *Ror* montrent des profils d'expression circadiens dans le système nerveux central et le foie, comme le montrent des expériences réalisées *in vivo* chez la souris (Ueda *et al.*, 2002). Les taux des transcrits *Rora* et *Rorb* suivent le même rythme circadien dans le système nerveux, avec un pic pendant le jour et un creux pendant la nuit. Le transcrit *Rorg* n'est pas détectable dans le système nerveux et suit des oscillations circadiennes dans le foie. Le transcrit *Rora* ne semble pas suivre de telles oscillations dans le foie et le transcrit *Rorb* n'est pas détectable dans ce tissu. Ces résultats suggèrent un rôle des récepteurs ROR dans le fonctionnement de l'horloge circadienne.

Comme nous l'avons vu précédemment, le récepteur nucléaire ROR α fait partie d'une famille composée de trois membres ayant chacun leurs spécificités d'expression et de fonction. Nous allons plus particulièrement nous intéresser à ROR α .

I.3. ROR α et régulation de la transcription

I.3.1. Modes de liaison à l'ADN

L'analyse structure/fonction des isoformes de ROR α montre qu'elles possèdent des propriétés uniques de liaison à l'ADN (McBroom *et al.*, 1995).

I.3.1.1. Elément de réponse de ROR α

La séquence d'ADN consensus à laquelle se fixe ROR α a été définie en utilisant une stratégie couplant les techniques de retardement de migration électrophorétique et de PCR. Cette stratégie permet de sélectionner des oligonucléotides ayant la plus forte affinité pour ROR α à partir d'un pool d'oligonucléotides dégénérés. La séquence du RORE lié par ROR α correspond à un motif a/gGGTCA précédé en 5' par une séquence riche en A/T (Giguere *et al.*, 1994). Des spécificités similaires de liaison à l'ADN ont été mises en évidence pour les récepteurs ROR β et ROR γ (Carlberg *et al.*, 1994; Greiner *et al.*, 1996; Medvedev *et al.*, 1996).

I.3.1.2. Fixation à l'ADN

Plusieurs études, faisant appel à la technique de retardement de migration électrophorétique, ont montré que ROR α se lie aux ROREs sous forme de monomère (Carlberg *et al.*, 1994; Giguere *et al.*, 1994; Giguere *et al.*, 1995a; Moraitis et Giguere, 1999; Gawlas et Stunnenberg, 2000; figure 11). ROR β et ROR γ sont aussi des récepteurs monomériques (Carlberg *et al.*, 1994; Medvedev *et al.*, 1996; Gawlas et Stunnenberg, 2000). Par ailleurs, ROR α ne forme pas d'hétérodimère avec les RXRs (Giguere *et al.*, 1994).

L'analyse de protéines ROR α dans lesquelles diverses délétions ont été réalisées a montré que les deux doigts de zinc étaient nécessaires mais pas suffisants pour assurer une liaison de ROR α au RORE (Giguere *et al.*, 1995a). Des expériences de retardement de migration électrophorétique indiquent que la région située entre les acides aminés 35 et 45 est importante pour la liaison de ROR α 1 à l'ADN. La CTE située entre les acides aminés 138 et 166 est aussi importante pour la liaison de ROR α 1 à l'ADN. Des analyses par interférence de méthylation indiquent que les doigts de zinc de ROR α interagissent avec le grand sillon d'ADN au niveau du motif AGGTCA, alors que la CTE contacte le petit sillon adjacent au

niveau de la région riche en A/T du RORE (Giguere *et al.*, 1995a). Les contacts spécifiques de la CTE avec l'ADN sont analogues à ceux observés pour l'homodimère Rev-Erb α (Zhao *et al.*, 1998). De plus, la substitution dans le DBD de ROR α de seulement 4 nucléotides par ceux présents chez Rev-Erb α , est suffisante pour conférer à ROR α la capacité de former des homodimères (Moraitis et Giguere, 1999). Enfin, la liaison de ROR α à l'ADN provoque une courbure de l'ADN (McBroom *et al.*, 1995), et des délétions de la région charnière et de la région amino-terminale de ROR α altèrent les caractéristiques d'interaction ROR α /ADN telles que la courbure.

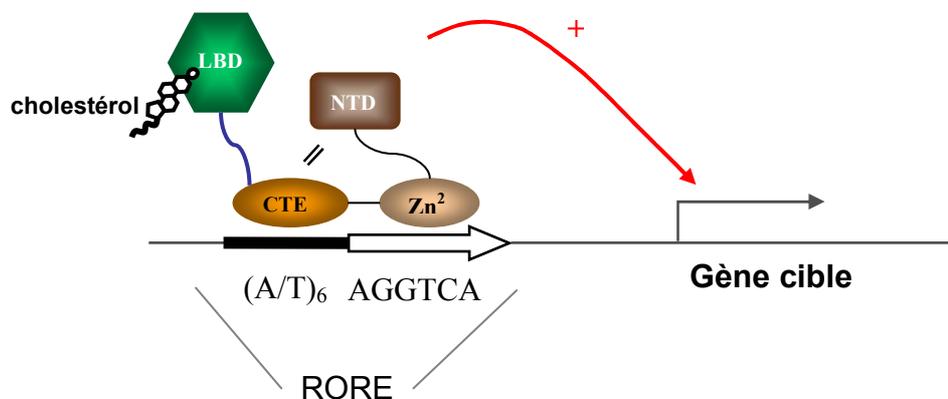


Figure 11: Représentation de la fixation de ROR α sur son élément de réponse dans le promoteur des gènes cibles.

1.3.1.3. Spécificité de liaison à l'ADN des différentes isoformes

Bien que tous les RORs lient l'ADN au niveau de motifs a/gGGTCA précédés par une séquence riche en A/T, les différentes isoformes montrent des affinités distinctes pour des ROREs différents, comme cela a été montré dans le cas de ROR α 1 et ROR α 2 (Giguere *et al.*, 1994) et de ROR β 1 et ROR β 2 (Andre *et al.*, 1998a). En ce qui concerne ROR α , le site consensus est 5'-DWWWNWAGGTCA-3' pour ROR α 1 et 5'-WWAWNTAGGTCA-3' pour ROR α 2 (N=A, T, G ou C ; D=A, T ou G ; W=A ou T). L'extrémité amino-terminale étant la seule différence entre les isoformes d'un même type (ici type α ou type β), cette région est désignée comme celle qui influence la spécificité de liaison des RORs à leurs ROREs. En effet, le domaine amino-terminal de ROR α 1 ou celui de ROR α 2 confère les spécificités de liaisons aux ROREs à des récepteurs hétérologues, comme cela a été montré dans le cas du récepteur T₃R β (Giguere *et al.*, 1994). Les différences d'affinité des isoformes ROR pour

divers ROREs peut être la base de régulations différentielles de gènes cibles par les isoformes ROR.

1.3.2. ROR α , un activateur transcriptionnel?

De nombreuses analyses d'activité ROR α , basées sur des expériences de co-transfection de vecteurs d'expression ROR α et de vecteurs rapporteurs dépendant de ROREs, ont démontré que ROR α (Forman *et al.*, 1994; Giguere *et al.*, 1994; Schrader *et al.*, 1996), tout comme ROR β (Carlberg *et al.*, 1994; Greiner *et al.*, 1996) et ROR γ (Medvedev *et al.*, 1996), est un activateur transcriptionnel constitutif dans divers types cellulaires en l'absence de ligand exogène (Atkins *et al.*, 1999).

Bien que la plupart des observations réalisées identifient ROR α comme un activateur transcriptionnel, certains résultats indiquent que ROR α se comporte aussi comme un répresseur transcriptionnel dans certains types cellulaires.

En effet, une étude a montré qu'une protéine contenant la partie carboxy-terminale de ROR α 1 (acides aminés 140 à 523) fusionnée à un domaine hétérologue de liaison à l'ADN se comporte comme un activateur transcriptionnel dans les cellules de choriocarcinome humain JEG-3 et comme un répresseur transcriptionnel dans les cellules de rein humain 293T (Harding *et al.*, 1997). De plus, l'analyse de protéines de fusion contenant des protéines ROR α 1 avec diverses délétions a révélé la présence de domaines d'activation et de répression transcriptionnelle dans ROR α 1. Le domaine d'activation est localisé à l'extrémité carboxy-terminale de la protéine ROR α , il correspond à la région AF-2. Le domaine de répression est situé dans la région charnière, il apparaît plus actif dans certains types cellulaires.

Ces données suggèrent que l'activité transcriptionnelle de ROR α est modulée selon le contexte qui dépend notamment de la présence de divers co-facteurs.

1.3.3. Les co-activateurs et les co-répresseurs de ROR α

Le contrôle de la transcription par ROR α implique des co-facteurs. De nombreux co-facteurs de ROR α ont été identifiés, parmi eux des protéines interagissant avec le récepteur aux glucocorticoïdes (GRIP, *Glucocorticoid Receptor-Interacting Protein*) des protéines interagissant avec TR (TRIPs, *T₃ Receptor-Interacting Proteins*), et des protéines associées à

TR (TRAPs, *T₃ Receptor-Associated Proteins*). Une analyse double-hybride dans la levure a démontré que le domaine carboxy-terminal de ROR α 1 (acides aminés 272 à 523) interagit avec les co-activateurs TRIP-1, TIF-1 (*Transcription Intermediary Factor-1*), TRIP-230 (nommé aussi TRIP-11), PBP (*Peroxisome proliferator-Binding Protein*, nommé aussi TRIP-2, DRIP 205 et TRAP220) et GRIP-1 (nommé aussi TIF-2; Atkins *et al.*, 1999).

ROR α interagit aussi physiquement avec p300/CBP, SRC-1 et p/CIP (*CBP Interacting Protein*; Lau *et al.*, 1999; Moraitis *et al.*, 2002). Par ailleurs, des expériences de co-immunoprécipitation montrent que ROR α interagit avec le co-activateur β -caténine (Gold *et al.*, 2003). Enfin, le domaine AF-2 de ROR α a une fonction critique dans le recrutement des co-activateurs et l'activité transcriptionnelle de ROR α (McBroom *et al.*, 1995; Harding *et al.*, 1997; Atkins *et al.*, 1999). Ce domaine est probablement bloqué en conformation "holo", ce qui pourrait permettre un recrutement des co-activateurs indépendamment de la présence d'un ligand (Harris *et al.*, 2002).

En ce qui concerne les co-répresseurs, ROR α interagit avec les co-répresseurs N-CoR et SMRT (Harding *et al.*, 1997). La région AF-2 semble inhiber cette interaction. Le co-répresseur Hr (*Hairless*), en interagissant physiquement avec ROR α , est capable de réprimer l'activité transactivatrice de ROR α (Moraitis *et al.*, 2002) en diminuant sa dégradation (voir §I.3.4.3).

1.3.4. Contrôle de l'activation transcriptionnelle par ROR α

Les récepteurs nucléaires peuvent fonctionner aussi bien en tant qu'activateurs que répresseurs, et pour la plupart des récepteurs, ces activités sont contrôlées par des ligands. Avec la découverte des récepteurs nucléaires orphelins, de nombreuses questions concernant l'activation des récepteurs nucléaires ont été soulevées. Les récepteurs nucléaires ont-ils tous des ligands, ou bien certains récepteurs agissent-ils en répresseurs ou activateurs constitutifs de la transcription? Certains récepteurs sont-ils activés par des mécanismes autres que la fixation d'un ligand, comme la phosphorylation? En effet, la plupart, si ce n'est tous les récepteurs nucléaires semblent être phosphorylés. Des altérations de la phosphorylation peuvent affecter le récepteur de multiples façons, parmi lesquelles la modulation de leur activité et de la stabilité de la protéine.

De nombreuses études ont été menées quant à l'existence de ligands pour ROR α , quant au contrôle de son activité par des phosphorylations ou par la stabilisation/dégradation de la protéine.

1.3.4.1. A la recherche de ligands pour ROR α

Comme de nombreux récepteurs nucléaires clonés sur la base d'une homologie de séquence avec les récepteurs connus, les RORs ont été nommés récepteurs nucléaires "orphelins", parce que la nature de leur ligand était inconnue.

Aucun ligand exogène n'étant nécessaire ni pour son interaction avec des co-activateurs, ni pour son activation dans des systèmes aussi variés que les levures, les bactéries ou les cellules humaines, ROR α a, pendant longtemps, été considéré comme un activateur transcriptionnel constitutif, indépendant de la présence d'un ligand exogène (Atkins *et al.*, 1999). Comme ROR β est fortement exprimé dans la glande pinéale, la principale source de mélatonine, l'hypothèse que la mélatonine pourrait être le ligand pour les RORs a été formulée. Des études initiales ont rapporté que la mélatonine pouvait se lier à ROR β , mais aussi à ROR α et augmenter l'activité transactivatrice de ces récepteurs (Becker-Andre *et al.*, 1994; Wiesenberg *et al.*, 1995). Cependant, des études supplémentaires menées par plusieurs laboratoires n'ont pas réussi à démontrer la liaison de la mélatonine aux RORs, ni l'activation des RORs par cette hormone (Tini *et al.*, 1995; Greiner *et al.*, 1996). Ces données suggèrent que la mélatonine n'est pas un ligand pour les RORs. Plusieurs dérivés de thiazolidine, dont l'agent CGP52608 qui présente une activité anti-arthritique puissante, ont été décrits comme des activateurs spécifiques de la transactivation par ROR α et ROR β (Wiesenberg *et al.*, 1995; Missbach *et al.*, 1996; Wiesenberg *et al.*, 1998). Cependant, d'autres études sont nécessaires pour confirmer que ces agents sont de vrais ligands synthétiques pour les RORs.

La question de la nature du (des) ligand(s) des RORs est donc restée sans réponse jusqu'à la fin de l'année 2002, date à laquelle le cholestérol ou l'un de ses dérivés a été proposé comme un ligand naturel de ROR α (Kallen *et al.*, 2002). En effet, la résolution de la structure du LBD de ROR α par cristallographie a permis de révéler la présence de cholestérol dans la poche de liaison au ligand du récepteur nucléaire. Une autre étude, menée sur le LBD de ROR α exprimé dans les cellules d'insecte Sf-9 (*Spodoptera frugiperda* 9) et purifié à partir de ces cellules, a montré que les principaux ligands de ROR α étaient le cholestérol et le 7-déhydrocholestérol (pro-vitamine D₃; Bitsch *et al.*, 2003). Cette étude, basée sur une approche

1^{ère} partie ROR α : Régulation de la transcription

par spectrométrie de masse, a également permis de montrer, par échange de ligands, que le sulfate de cholestérol avait une affinité plus forte pour le LBD de ROR α que le cholestérol. La structure du LBD de ROR α complexé au sulfate de cholestérol a aussi été déterminée par cristallographie (Kallen *et al.*, 2004). De plus, la déplétion en cholestérol de cellules d'ostéosarcome U-20S semble provoquer une diminution de la transactivation par ROR α (Kallen *et al.*, 2002). Cette activité est partiellement restaurée par l'ajout de cholestérol ou de ses dérivés comme le 7-déhydrocholestérol ou le sulfate de cholestérol. De plus, des mutations de résidus du LBD qui empêchent la liaison au cholestérol diminuent aussi l'activité transcriptionnelle de ROR α (Kallen *et al.*, 2002).

Le cholestérol apparaît donc comme le ligand naturel de ROR α . Par ailleurs, une étude récente indique que le ligand naturel de ROR β pourrait être l'acide rétinoïque tout-trans (Stehlin-Gaon *et al.*, 2003). Aucun ligand n'a encore été proposé pour ROR γ .

*1.3.4.2. Contrôle de l'activité de ROR α par des kinases?***- Protéines kinase A et C.**

Comme les autres récepteurs nucléaires, ROR α est une phosphoprotéine, bien que les sites précis de phosphorylation n'aient pas encore été déterminés. ROR α 1 contient des sites potentiels de phosphorylation par la protéine kinase C en Ser35 et Thr53, et un site potentiel de phosphorylation par la protéine kinase A en Ser49 (Giguere *et al.*, 1995a).

- Le signal calcium et la kinase CaMKIV.

L'activité transactivatrice de ROR α est modulée par la kinase CaMKIV dépendante du signal calcium.

L'élévation du taux de Ca²⁺ joue un rôle prédominant dans de nombreuses fonctions cellulaires dont l'activation de la transcription. Le signal Ca²⁺ est principalement relayé par la calmoduline (CaM) qui sert de récepteur du Ca²⁺ dans le cytoplasme et le noyau (Means, 2000). La CaM liée au Ca²⁺ active rapidement des enzymes telles que les protéines kinases.

Les CaMKs (*CaM Kinases*), dont trois membres sont connus (CaMK-I, -II, et -IV), font partie d'une famille de sérine/thréonine protéines kinases dépendantes de la CaM/Ca²⁺ et sont capables de phosphoryler une variété de substrats (Means, 2000). CaMKIV est aussi capable d'augmenter l'activité transactivatrice de ROR α (Kane et Means, 2000). En effet, des

expériences de co-transfection ont montré qu'une forme constitutivement active de CaMKIV stimule l'activité transactivatrice de ROR α sur un RORE. Au contraire, la co-transfection d'une CaMKIV dépourvue d'activité catalytique n'a aucun effet sur l'activité ROR α . Un effet similaire à celui de CaMKIV sur ROR α a été montré pour CaMKI, mais pas pour CaMKII. De plus, la stimulation de l'activité ROR α est observée dans des cellules traitées par l'ionomycine, un ionophore qui provoque une augmentation du taux de Ca²⁺ intracellulaire. ROR α est donc un facteur de transcription sensible au Ca²⁺. Bien que ROR α 1 contienne deux sites putatifs pouvant être phosphorylés (Ser 49 et Ser 58), la mutation de ces sites n'altère pas l'effet de CaMKIV sur l'activité transcriptionnelle de ROR α . De plus, la CaMKIV est incapable de phosphoryler une protéine ROR α produite *in vitro* et le LBD de ROR α est suffisant pour observer l'effet stimulateur de CaMKIV. Ces données indiquent que l'effet de CaMK (-I ou -IV) sur l'activité de ROR α n'implique pas une phosphorylation de la protéine ROR α . Il est possible que CaMK (-I ou -IV) phosphoryle d'autres protéines nucléaires comme les co-facteurs de ROR α . Ces résultats permettent d'imaginer que les voies de signalisation provoquant une augmentation de l'influx de Ca²⁺ sont capables d'augmenter l'activation de la transcription par ROR α dans les cellules qui expriment ROR α et CaMK (-I ou -IV).

Contrairement à CaMKI et CaMKII dont l'expression est ubiquitaire, l'expression de CaMKIV est limitée au cerveau, aux lymphocytes T et aux cellules germinales mâles en phase post-méiotique. Ce profil d'expression suggère que le contrôle de l'activité de ROR α par CaMKIV ne s'exerce que dans certaines conditions physiologiques et dans un nombre limité de tissus.

1.3.4.3. Dégradation de ROR α par le système ubiquitine-protéasome.

Le système ubiquitine-protéasome (Glickman et Ciechanover, 2002) est le système majeur utilisé par les eucaryotes pour dégrader sélectivement des protéines qui jouent des rôles clés dans divers processus cellulaires comme la régulation du cycle cellulaire, la différenciation, la transduction du signal et la transcription. La voie protéolytique utilisant l'ubiquitine (Ub, protéine de 76 acides aminés) et le protéasome fonctionne en deux grandes étapes (figure 12).

Dans un premier temps, le substrat à dégrader est marqué par liaison covalente d'une chaîne de poly-ubiquitine grâce à l'action d'une cascade enzymatique impliquant trois types d'enzymes: E1 (Ub-activating enzyme), E2 (Ub-conjugating enzyme) et E3 (Ub-ligase).

L'attachement covalent de l'Ub se fait par une liaison isopeptidique à un résidu Lys du substrat. E1 active l'Ub de manière dépendante de l'ATP, et la transmet à E2, qui également fixe l'Ub et qui catalyse le transfert de l'Ub sur le substrat via E3 qui permet une spécificité de reconnaissance du substrat. La réaction de conjugaison de l'Ub a lieu plusieurs fois, l'Ub étant conjuguée à elle-même, ce qui aboutit à la formation d'une chaîne de poly-Ub sur le substrat. L'ubiquitinylation est réversible: les molécules d'Ub peuvent être séparées du substrat par des enzymes de dé-ubiquitinylation.

Dans un deuxième temps, le substrat poly-ubiquitylé est reconnu et dégradé par le complexe du protéasome 26S.

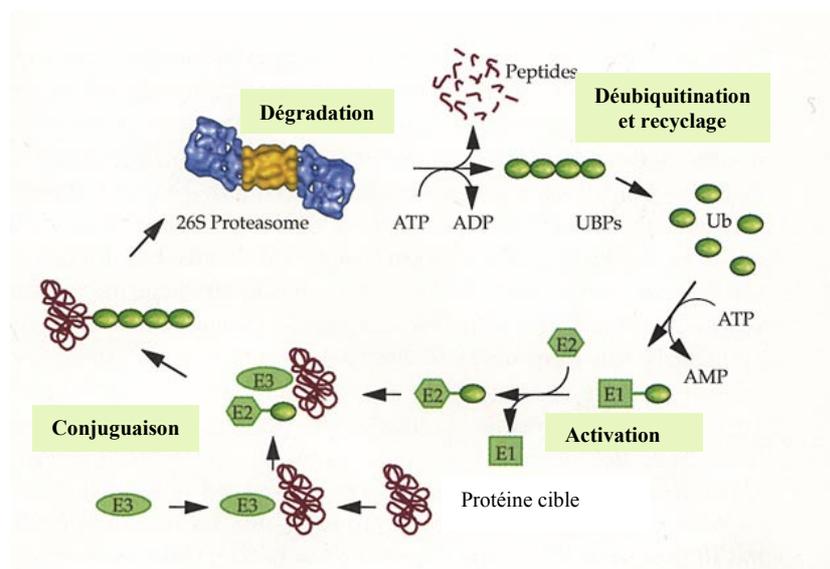


Figure 12: Le système protéolytique ubiquitine-protéasome. Reproduit de <http://www.hgu.mrc.ac.uk/Research/Gordon/>

Une étude montre que la protéine ROR α est une cible du système ubiquitine-protéasome (Moraitis et Giguere, 2003). Les auteurs de cette étude montrent notamment que la protéine ROR α a une demi-vie égale à 1,3 heures dans des cellules Cos-1 en culture et que le taux de protéine ROR α est augmenté sous l'effet d'un traitement des cellules avec un inhibiteur du protéasome 26S (le MG-132). L'absence de détection de protéine ROR α ubiquitylée dans les cellules non traitées indique que ROR α -Ub est rapidement dégradée par le protéasome 26S. La transactivation de la transcription par ROR α nécessite la dégradation de la protéine ROR α par le protéasome. En effet, le traitement de cellules par le MG-132 a un effet inhibiteur sur l'activité transcriptionnelle de ROR α . Cette observation peut s'expliquer par le fait que le blocage du protéasome conduit à l'accumulation de protéines ROR α ubiquitylées non fonctionnelles. L'analyse de protéines ROR α contenant des

mutations ponctuelles dans la région transactivatrice AF-2 suggère que la dégradation de ROR α par le protéasome nécessite un domaine AF-2 intact.

Par ailleurs, il a été montré que l'interaction de ROR α avec son co-répresseur Hairless (Hr) stabilise la protéine ROR α . Cet effet protecteur de Hr nécessite l'intégrité de ses deux motifs LXXLL impliqués dans l'interaction avec ROR α . Ces observations suggèrent que la répression de l'activité de ROR α par Hr est la conséquence de la stabilisation du complexe ROR α /Hr.

1.3.5. Interactions fonctionnelles avec d'autres récepteurs

Le récepteur nucléaire ROR α partage des spécificités de liaison à l'ADN avec d'autres récepteurs nucléaires tels que ERR (*Estrogen-Related Receptor*; Sladek *et al.*, 1997), NGFI-B (*Nerve Growth Factor-Induced B*)/Nurr77 (Wilson *et al.*, 1991), SF-1 (*Steroidogenic Factor-1*; Lala *et al.*, 1992) et Rev-Erb (Harding et Lazar, 1993). En effet, ces récepteurs ont la capacité de lier l'ADN sous forme monomérique au niveau d'un demi-site de type A/GGGTCA. Ils peuvent donc entrer en compétition entre eux pour se lier à l'ADN. Le type et l'étendue de l'interaction fonctionnelle entre les voies de signalisation de deux récepteurs nucléaires dépendent de la co-expression des récepteurs dans la cellule, de la présence de leurs ligands et co-facteurs spécifiques et de leur affinité pour le même élément de réponse.

1.3.5.1. Interactions fonctionnelles entre ROR α et Rev-Erb

Les deux membres de la famille Rev-Erb, Rev-Erb α et - β , possèdent des caractéristiques particulières. Premièrement, le gène Rev-Erb α a été découvert parce qu'il était localisé sur le brin opposé à celui de T₃R α (Miyajima *et al.*, 1989). Le gène Rev-Erb β , cloné simultanément par plusieurs groupes (Dumas *et al.*, 1994; Forman *et al.*, 1994; Retnakaran *et al.*, 1994), est lui étroitement lié au gène T₃R β . Deuxièmement, les récepteurs Rev-Erb peuvent se lier à l'ADN soit sous forme de monomères, soit sous forme d'homodimères (Retnakaran *et al.*, 1994). Le site consensus monomérique reconnu par Rev-Erb est GAATGTAGGTCA; dans cette séquence le T en position -1 et A en -4 par rapport au AGGTCA sont essentiels pour une liaison de forte affinité (Retnakaran *et al.*, 1994). Troisièmement, les LBDs de Rev-Erb ne possèdent pas de domaine AF-2: cette caractéristique peut être liée au fait que les récepteurs Rev-Erbs sont des répresseurs constitutifs de la transcription génique (Retnakaran *et al.*, 1994).

La répression transcriptionnelle par les Rev-Erbs est médiée par des interactions directes avec les co-répresseurs des récepteurs nucléaires, N-CoR, SMRT (*Silencing Mediator for RAR and Thyroid hormone receptor*), et SUN-CoR (Downes *et al.*, 1996). La répression transcriptionnelle via des sites monomériques peut impliquer deux types de mécanismes: soit un mécanisme passif de compétition pour des facteurs de transcription activateurs ou pour des composants de la machinerie transcriptionnelle basale, soit un mécanisme actif indépendant.

Les récepteurs nucléaires Rev-Erb α et Rev-Erb β sont décrits comme des répresseurs transcriptionnels qui lient l'ADN sous forme de monomères ou d'homodimères (Retnakaran *et al.*, 1994; Harding et Lazar, 1995). Il a été montré que, par compétition pour la liaison à un même élément de réponse, Rev-Erb α et Rev-Erb β inhibent l'effet transactivateur de ROR α (Forman *et al.*, 1994; Akashi et Takumi, 2005; Guillaumond *et al.*, 2005). De plus, la répression du gène *N-myc* par Rev-Erb β peut être levée par l'expression de ROR α , par un mécanisme qui implique la compétition entre ROR α et Rev-Erb β (Dussault et Giguere, 1997). De façon intéressante, il a été montré que l'expression de Rev-Erb α est un gène cible de ROR α , ajoutant un degré d'interaction entre ces deux types de récepteurs (Delerive *et al.*, 2002; voir aussi §I.4).

Les récepteurs RORs et Rev-Erbs ont tous les deux des profils d'expression ubiquitaires. Ils sont co-exprimés dans de nombreux tissus, notamment dans le cerveau, le muscle squelettique, le cœur et le foie (Becker-Andre *et al.*, 1993; Forman *et al.*, 1994; Steinmayr *et al.*, 1998). Il est donc très probable que ces récepteurs nucléaires soient impliqués dans les mêmes processus physiologiques. Cela semble être le cas, notamment en ce qui concerne la différenciation musculaire (Downes *et al.*, 1995; Lau *et al.*, 1999) et la différenciation adipocytaire (Chawla et Lazar, 1993; Austin *et al.*, 1998). L'expression de Rev-Erb α dans le foie est stimulée par les fibrates via un autre récepteur nucléaire, PPAR α (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α*). Ainsi, Rev-Erb pourrait également intervenir dans le métabolisme lipidique (Gervois *et al.*, 1999).

De plus, il est intéressant de remarquer que, comme pour ROR α , l'expression des transcrits codant pour les récepteurs Rev-Erb α et Rev-Erb β suit un rythme circadien dans le système nerveux central de souris (Ueda *et al.*, 2002). Cette information suggère une interaction fonctionnelle de ces récepteurs dans le fonctionnement de l'horloge circadienne (voir §I.5.8).

1.3.5.2. Interactions fonctionnelles entre ROR α et T₃R

L'hormone thyroïdienne (tétra-iodo-L-thyronine, T₄; tri-iodo-L-thyronine, T₃) joue un rôle clé dans la croissance et la différenciation du système nerveux. En effet, un déficit en hormone thyroïdienne pendant la période périnatale provoque des défauts neurologiques dans le cervelet de rongeur en développement (pour revue récente de la littérature, voir Yen, 2001), en particulier dans le cervelet (Nicholson et Altman, 1972a, b, c). La T₃ est la forme transcriptionnellement active de l'hormone thyroïdienne, elle se lie au récepteur nucléaire T₃R. Le récepteur T₃R lié à son ligand se fixe à des éléments de réponse à l'hormone thyroïdienne (TRE/*Thyroid Hormone-Response Element*) sous forme de monomère, d'homodimère et d'hétérodimère avec RXR (Yen, 2001). Ces complexes activent ou répriment la transcription de gènes cibles d'une manière dépendante du ligand.

Plusieurs observations indiquent l'existence d'interactions fonctionnelles entre les récepteurs nucléaires ROR α et T₃R. Dans le cervelet, un traitement T₄ provoque, en période périnatale, une augmentation du taux de transcrits *Rora* dans le cervelet (Koibuchi et Chin, 1998). Ces résultats suggèrent que l'hormone thyroïdienne contrôle l'expression du gène *Rora* dont le produit régule lui-même l'expression de gènes essentiels pour un développement normal du système nerveux central, en particulier du cervelet. De façon intéressante, en dépit d'un fonctionnement thyroïdien normal, les souris dépourvues de ROR α fonctionnel présentent également des anomalies de développement du cervelet (voir §I.5.1), cependant très aggravées comparé aux animaux hypothyroïdiens (Hamilton *et al.*, 1996).

Une autre étude montre, grâce à des expériences de co-transfection et d'expression transitoire, que ROR α stimule la transactivation dépendante du T₃R (T₃R α et T₃R β) lié à son ligand (Koibuchi *et al.*, 1999). Cet effet stimulateur de ROR α est observé sur des TREs de configurations différentes (ER, IR, DR). Au contraire, ROR α n'a pas d'effet sur la répression transcriptionnelle dépendante du T₃R non lié à son ligand. De plus le T₃R n'affecte pas la transactivation dépendante de ROR α lié au RORE. Ces résultats indiquent que ROR α peut modifier l'action du T₃R lié à son ligand sur les gènes sensibles à l'hormone thyroïdienne. De plus, un sous-groupe de TREs peut servir d'éléments de réponse communs pour ROR α et T₃R. Ainsi, des modifications du niveau d'expression d'un des deux récepteurs pourraient affecter la compétition entre ROR α et T₃R pour de tels éléments de réponse et, par conséquent, modifier la transcription de gènes spécifiques.

D'autre part, comme nous l'avons discuté dans le cas de ROR α , la kinase calcium-dépendante CaMKIV stimule l'activité transactivatrice de T₃R α lié à son ligand (Kuno-Murata *et al.*, 2000). En effet, des expériences de co-transfection et d'expression transitoire ont montré qu'une forme constitutivement active de CaMKIV stimule l'activité transactivatrice de T₃R α sur un TRE en présence de T₃, sans modifier l'effet répresseur de T₃R α en l'absence de son ligand. CaMKIV a donc le même effet que ROR α sur l'activité transcriptionnelle de T₃R. De plus, lorsque des vecteurs d'expression pour ROR α et CaMKIV sont co-transfectés, un effet stimulateur additif est observé sur l'activité T₃R α lié à son ligand (Kuno-Murata *et al.*, 2000).

Le co-répresseur transcriptionnel Hr (Hairless) participe aussi à l'interaction fonctionnelle entre ROR α et T₃R. En effet, le gène *hr* est un gène dont l'expression est contrôlée par l'hormone thyroïdienne (Thompson, 1996; Thompson et Bottcher, 1997). De plus, le co-répresseur Hr participe à la répression transcriptionnelle dépendante de T₃R non lié à son ligand (Potter *et al.*, 2001). Hr, qui est aussi un co-répresseur de ROR α (Moraitis *et al.*, 2002), est donc un élément commun entre les voies de régulation des récepteurs nucléaires ROR α et T₃R. Ces résultats renforcent donc le lien entre les processus physiologiques contrôlés par ROR α et ceux contrôlés par l'hormone thyroïdienne.

L'interaction fonctionnelle entre ROR α et T₃R, qui implique des partenaires communs comme la CaMKIV et Hr, est susceptible de jouer un rôle important, notamment dans la différenciation des cellules de Purkinje.

I.4. Les gènes cibles de ROR α

Un grand nombre de gènes cibles potentiels de ROR α ont été identifiés sur la base de la présence de ROREs fonctionnels dans leurs régions promotrices 5'. Cependant, pour nombre d'entre eux, la régulation par ROR α dans des conditions physiologiques n'a pas été démontrée. Le contrôle par ROR α de certains gènes cibles est associé à certains phénotypes du mutant homozygote *staggerer Rora^{sg/sg}*, souris chez lesquelles le gène ROR α est muté (voir §I.5). La liste de ces gènes est présentée dans la table I, et je décrirai par la suite certains de ces gènes cibles.

Gènes	Références
Bmall (s)	Sato <i>et al.</i> , 2004; Akashi et Takumi, 2005
Sonic Hedgehog (s)	Gold <i>et al.</i> , 2003
N-myc (h, s)	Dussault et Giguere, 1997
PCP-2 (s)	Hamilton <i>et al.</i> , 1996; Schrader <i>et al.</i> , 1996; Matsui, 1997
Prosaposine (s)	Jin <i>et al.</i> , 1998
Laminine B1 (s)	Matsui <i>et al.</i> , 1995; Matsui, 1996
γ F-crystalline (s, p)	Tini <i>et al.</i> , 1995; Schrader <i>et al.</i> , 1996
BFE (s)	Schrader <i>et al.</i> , 1996; Winrow <i>et al.</i> , 1998
I- κ B α	Delerive <i>et al.</i> , 2001
p21 ^{Waf-1/Cip-1} (h, s)	Schrader <i>et al.</i> , 1996
Apolipoprotéine A-I (r,s)	Vu-Dac <i>et al.</i> , 1997
Apolipoprotéine C-III (h)	Raspe <i>et al.</i> , 2001
Apolipoprotein A-V (h)	Lind <i>et al.</i> , 2005
Oxytocine (s)	Chu et Zingg, 1999
Rev-Erb α (h)	Delerive <i>et al.</i> , 2002; Raspe <i>et al.</i> , 2002
RAR β (h)	Schrader <i>et al.</i> , 1996
PPAR γ (h)	Sundvold et Lien, 2001
BSP (s, r, h)	Schrader <i>et al.</i> , 1996; Meyer <i>et al.</i> , 2000
5-lipoxygénase (h)	Schrader <i>et al.</i> , 1996
α -fœtoprotéine (r)	Bois-Joyeux <i>et al.</i> , 2000
Fibrinogène β	Chauvet <i>et al.</i> , 2005
CRBP-I (s)	Schrader <i>et al.</i> , 1996

Table 1 : Gènes cibles potentiels de ROR α . (h : humain, p : poulet, r : rat, s: souris).

- Sonic Hedgehog

Une étude récente montre que le promoteur du gène codant Sonic hedgehog (SHH), un régulateur mitogénique impliqué dans le développement du cervelet, est un promoteur cible de ROR α *in vivo* (expériences d'immunoprécipitation de la chromatine ou ChIP; Gold *et al.*, 2003). De plus, ROR α recrute les co-activateurs transcriptionnels β -caténine et p300 au niveau du promoteur *Shh*. En l'absence de protéine ROR α fonctionnelle chez le mutant *staggerer* (*Rora*^{sg/sg}), la prolifération des grains est diminuée dans des cultures organotypiques de cervelet, alors que l'ajout de Shh recombinant restaure une prolifération cellulaire normale (Gold *et al.*, 2003). Le taux d'ARNm *Shh* est fortement diminué dans le cervelet de souris *Rora*^{sg/sg} par rapport à celui des souris *Rora*^{+/+} (Gold *et al.*, 2003). Dans le cervelet, Shh - synthétisé par les cellules de Purkinje - est un signal mitogène crucial pour les grains (Dahmane et Ruiz-i-Altaba, 1999). L'inhibition de la voie de transduction initiée par Shh dans les grains conduit à une forte diminution de la population des grains dans le cervelet (Dahmane et Ruiz-i-Altaba, 1999), alors que l'activation trop importante de la voie Shh a été associée à la prolifération anarchique des précurseurs des grains pouvant mener à la formation de médulloblastome (pour revue de la littérature, voir Wechsler-Reya et Scott, 2001). Le contrôle transcriptionnel de Shh est associé à des anomalies de genèse des grains dans le cervelet du mutant homozygote *staggerer* (voir §I.5.1 et II.6.1.2).

- Purkinje Cell Protein-2

Le gène codant pour la protéine PCP-2 est un gène qui s'exprime principalement dans les cellules de Purkinje du cervelet, cellules dans lesquelles la protéine ROR α est abondante. L'expression du gène *Pcp-2* est fortement diminuée dans le cervelet de souris *Rora*^{sg/sg} par rapport à celui des souris *Rora*^{+/+} (Hamilton *et al.*, 1996; Gold *et al.*, 2003). De plus, un RORE a été identifié dans le promoteur du gène *Pcp-2*. ROR α se lie à ce RORE sous forme de monomère et active la transcription du gène *Pcp-2* à partir de cet élément de réponse (Matsui, 1997). Des expériences de micro-injection dans des cellules CV-1 d'un vecteur d'expression pour ROR α et d'un vecteur rapporteur contenant le gène *LacZ* sous le contrôle du promoteur du gène *Pcp-2* confirment le rôle activateur de ROR α sur le promoteur du gène *Pcp-2* (Gold *et al.*, 2003). Le récepteur T₃R participe aussi au contrôle de la transcription du gène *Pcp-2* (Zou *et al.*, 1994). Cette information souligne l'existence d'une interaction fonctionnelle entre ROR α et T₃R dans le cervelet. Il est à noter que la perte de l'expression de

PCP-2 dans le cervelet des souris déficientes ne semble pas être responsable du phénotype cérébelleux des mutants *staggerer* (voir §I.5.1) puisque les souris transgéniques chez lesquelles le gène *Pcp-2* a été inactivé présentent un cervelet normal (Mohn *et al.*, 1997; Vassileva *et al.*, 1997).

- γ F-crystalline

Un autre exemple de gène co-régulé par ROR α et T₃R dans le système nerveux est fourni par le gène *γ F-crystalline* qui s'exprime spécifiquement dans le cristallin et qui code pour une protéine de structure de ce tissu. ROR α se lie sous forme de monomère au même élément de réponse (γ F-HRE) que T₃R/RXR et RAR/RXR, localisé dans le promoteur du gène *γ F-crystalline* de souris (Tini *et al.*, 1994; Tini *et al.*, 1995). Ceci suggère que ces récepteurs nucléaires entrent en compétition pour se lier à l'élément γ F-HRE. De plus, ROR α , comme T₃R et RAR (- α ou - β), stimule l'activité transcriptionnelle du promoteur de *γ F-crystalline* et cette stimulation nécessite l'intégrité de l'élément γ F-HRE. En l'absence d'acide rétinoïque, RAR α bloque l'effet stimulateur de ROR α , mais aussi celui de T₃R, à partir l'élément γ F-HRE.

- Laminine B1

La laminine B1 est une protéine de la matrice extra-cellulaire impliquée dans la croissance des neurites. Des expériences de transfection et d'expression transitoire indiquent que ROR α stimule l'activité du promoteur *laminine B1* (Matsui *et al.*, 1995; Matsui, 1996). Cet effet est inhibé par la co-transfection d'un vecteur d'expression pour RAR, certainement parce que RAR et ROR α entrent en compétition pour la liaison au même élément de réponse. En effet, le promoteur *laminine B1* contient un élément de réponse, le lamRARE, constitué de 3 demi-sites de type A/GGGTCAXA (ou X correspond à C, T ou G). Ces 3 demi-sites sont nécessaires pour conférer l'activation dépendante de RAR. ROR α se lie au demi-site localisé à l'extrémité 5' du lamRARE et seul ce demi-site est nécessaire à conférer l'activation dépendante de ROR α .

- Prosaposine

La prosaposine est une protéine multifonctionnelle avec des fonctions intra-cellulaires (régulation du catabolisme des glycosphingolipides) et extra-cellulaires (facteur de régénération des nerfs). La prosaposine est abondante dans le système nerveux central,

particulièrement dans les cellules de Purkinje du cervelet. ROR α se lie à un RORE situé dans le promoteur du gène *prosaposine* de souris (Jin *et al.*, 1998). Ce RORE stimule l'activité du promoteur *prosaposine* et ROR α participe, avec la protéine Sp4 (*Specificity protein 4*), à l'expression spécifique de tissu du gène dans le système nerveux central, comme cela a été montré par des études basées sur l'utilisation de souris transgéniques (Jin *et al.*, 2001).

- Bone Sialo-Protein et ostéocalcine

ROR α pourrait participer au contrôle de l'expression de gènes codant pour des composants de la matrice osseuse, la bone sialo-protein (BSP) et l'ostéocalcine. En effet, un RORE a été identifié dans le promoteur du gène de souris codant pour la BSP et ROR α 1 est capable d'activer la transcription à partir de ce promoteur dans la lignée cellulaire d'ostéosarcome de rat ROS17/2.8 (Means, 2000). Des ROREs putatifs ont aussi été identifiés dans le promoteur de BSP chez l'homme et chez le rat (Schrader *et al.*, 1996). La surexpression de ROR α 1 ne permet pas d'augmenter l'activité transcriptionnelle du promoteur du gène humain codant pour l'ostéocalcine. Cependant, ROR α 1 réprime l'effet transactivateur de la vitamine D (1,25(OH) $_2$ D $_3$) sur ce promoteur (Meyer *et al.*, 2000). Ceci suggère une interaction fonctionnelle entre la voie de signalisation dépendante de ROR α et celle du récepteur de la vitamine D. Le contrôle transcriptionnel de ces gènes par ROR α est associé à des anomalies du métabolisme de l'os chez le mutant homozygote *staggerer* (voir §I.5.2).

- I- κ B α

L'action anti-inflammatoire de ROR α est associée au contrôle transcriptionnel du gène codant pour I- κ B α (voir §I.5.3), l'inhibiteur du facteur de transcription pro-inflammatoire NF- κ B (Delerive *et al.*, 2001). En effet, ROR α 1, mais pas ROR α 2 ni ROR α 3, se lie à un RORE présent dans le promoteur du gène *I- κ B α* et active la transcription à partir de cet élément. De plus, ROR α 1 stimule l'activité du promoteur du gène *I- κ B α* de façon dépendante de l'intégrité du RORE. Le taux de transcrit *I- κ B α* est augmenté dans des cellules surexprimant la protéine ROR α 1 et diminué dans l'aorte de souris *Rora*^{sg/sg} par rapport à celle de souris *Rora*^{+/+}.

- Apolipoprotéine (Apo)A-I et ApoC-III

ROR α 1, mais pas ROR α 2 ni ROR α 3, stimule l'activité transcriptionnelle du promoteur du gène de rat codant pour l'apoA-I dans les cellules de carcinome du colon

humain Caco-2 (Vu-Dac *et al.*, 1997). Le RORE concerné recouvre en partie la boîte TATA et l'invalidation de cet élément par mutagenèse dirigée abolit l'effet stimulateur de ROR α 1 sur le promoteur. ROR α 1 se lie au RORE, mais pas à un RORE muté. Le RORE est en partie conservé dans le promoteur *apoA-I* de souris, deux nucléotides diffèrent entre le rat et la souris au niveau du motif AGGTCA. ROR α 1 active la transcription à partir du RORE de rat et du RORE de souris, comme le montrent des expériences de co-transfection et d'expression transitoire avec un vecteur composé du gène rapporteur *luciférase* sous le contrôle du promoteur TK (promoteur du gène *Thymidine Kinase* du virus de l'herpès simplex) et de l'un ou l'autre des ROREs. De plus, le taux de transcrit *apoA-I* est plus faible dans l'intestin de souris *Rora*^{sg/sg} que dans celui de souris *Rora*^{+/+}.

ROR α régule aussi l'expression du gène de l'apoC-III humain et de celui de souris (Raspe *et al.*, 2001). ROR α 1 stimule l'activité du promoteur *apoC-III* humain dans des lignées cellulaires d'origine hépatique (HepG2), intestinale (Caco-2) et rénale (RK13). ROR α 1 se lie à deux ROREs dans le promoteur *apoC-III* humain. Le RORE proximal joue un rôle majeur dans la sensibilité du promoteur à ROR α 1. Cet élément est presque totalement conservé chez la souris et il lie ROR α 1. De plus, des expériences de transfection et d'expression transitoire montrent que ROR α 1 active la transcription à partir du RORE humain, ou celui de souris, cloné en trois exemplaires en amont du promoteur TK et du gène rapporteur *luciférase*. Enfin, le taux de transcrit *apoC-III* est plus faible dans l'intestin et le foie de souris *Rora*^{sg/sg} que dans celui de souris *Rora*^{+/+}.

Le contrôle transcriptionnel de ces gènes est associé à des anomalies du métabolisme lipidique chez le mutant homozygote *staggerer* (voir §I.5.4).

- N-myc

Un RORE a été identifié dans le premier intron du proto-oncogène *N-myc* humain et dans celui de souris (Dussault et Giguere, 1997). ROR α 1 se lie aux ROREs humain et de souris et stimule la transcription à partir de ces éléments de réponse. La mutation du RORE de souris abolit la fixation de ROR α 1 et la transactivation dépendante de ce récepteur nucléaire. De plus, ROR α 1 augmente la production de transcrit *N-myc* lors d'expériences de co-transfection avec l'unité de transcription *N-myc* entière. Contrairement à ROR α , le récepteur nucléaire RVR/Rev-Erb β a un effet inhibiteur sur la transcription du gène *N-myc* à partir du RORE localisé dans le premier intron du gène. De plus, le taux d'ARNm *N-myc* est fortement

diminué dans le cervelet de souris *Rora*^{sg/sg} par rapport à celui de souris *Rora*^{+/+} (Gold *et al.*, 2003). Il est intéressant de remarquer que *N-myc* est aussi un gène cible de SHH (Kenney *et al.*, 2003), lui-même sous le contrôle de ROR α (Gold *et al.*, 2003). Ces données impliquent ROR α dans le contrôle de la cancérogenèse (voir §I.5.7).

- Oxytocine

Le promoteur du gène de souris codant pour le neuropeptide oxytocine est activé par ROR α (Chu et Zingg, 1999). Deux ROREs fonctionnels ont été mis en évidence dans le promoteur *oxytocine*. La mutation de ces éléments réduit l'activation dépendante de ROR α 1. De plus, ROR α 1 se lie directement à ces deux éléments, comme l'indiquent les résultats d'expériences de retardement de migration électrophorétique.

- Rev-Erb α

Un exemple très intéressant d'interaction fonctionnelle entre les récepteurs ROR α et Rev-Erb α est fourni par le gène *Rev-erba* lui-même. En effet, Rev-Erb α inhibe l'activité transcriptionnelle du promoteur de son propre gène (humain) à partir de l'élément Rev-DR2 (Adelmant *et al.*, 1996). Une étude montre que cet élément de réponse est aussi reconnu par ROR α 1 (Raspe *et al.*, 2002). De plus, l'élément Rev-DR2 confère la capacité à être stimulé par ROR α 1 à un promoteur hétérologue lors d'expériences de co-transfection et d'expression transitoire. L'invalidation du rev-DR2 abolit l'effet transactivateur de ROR α dans le contexte du promoteur *Rev-erba*. Une autre étude montre un effet transactivateur de ROR α 1 sur le promoteur *Rev-erba* à partir d'un élément de réponse distinct de l'élément Rev-DR2 (Delerive *et al.*, 2002). Par ailleurs, la surexpression stable de ROR α , dans les cellules d'hépatome humain HepG2 et dans les cellules myoblastiques de rat L6, conduit à une augmentation du taux de transcrit *Rev-erba*. La mutation *staggerer* à l'état homozygote provoque une diminution du taux de transcrit *Rev-erba* dans le muscle squelettique. *Rev-erba* est donc un gène cible de ROR α . Ainsi, l'interaction fonctionnelle entre ROR α et Rev-Erb α fait l'objet de rétro-contrôles dépendants des deux récepteurs nucléaires au niveau du gène *Rev-erba*.

Rev-Erb α n'est pas le seul récepteur nucléaire dont la transcription du gène est contrôlée par ROR α . En effet, un RORE putatif a été identifié dans le promoteur du gène humain codant pour RAR β . ROR α se lie à cet élément de réponse (Schrader *et al.*, 1996). De plus, le gène humain codant pour PPAR γ est un gène cible potentiel de ROR α . ROR α 1 se lie

à un RORE localisé dans un promoteur du gène codant pour PPAR γ (Sundvold et Lien, 2001). L'invalidation du RORE abolit l'effet transactivateur de ROR α 1 dans le contexte du promoteur du gène *PPARg*. PPAR γ ayant un rôle clé dans le contrôle de la différenciation adipocytaire, ces résultats renforcent le rôle de ROR α dans ce processus physiologique.

- **Bmall**

Un autre exemple de l'interaction fonctionnelle de ROR α et de Rev-Erb α dans le contrôle de l'expression d'un gène est donné par le gène *Bmall*, principal acteur de la régulation de la rythmicité de l'horloge circadienne (voir aussi §I.5.8 et figure 15). En effet, ROR α contrôle l'expression du gène *Bmall*, alors que Rev-Erb α réprime sa transcription (Akashi et Takumi, 2005; Guillaumond *et al.*, 2005; Ueda *et al.*, 2005).

L'expression rythmique de *Bmall* est dépendante de la fixation compétitive de ROR α (activation de la transcription) ou de Rev-Erb α (répression de la transcription) sur l'élément RORE présent dans son promoteur. *Rora* agit en coordination avec *Rev-erb α* et leur compétition sur les mêmes éléments de réponse dans le promoteur conduit le rythme de la transcription de *Bmall*.

- **Autres gènes**

Des ROREs fonctionnels ont aussi été identifiés dans des éléments *cis*-régulateurs de la transcription des gènes codant pour la BFE (*BiFunctional Enzyme*) aussi nommée énoyl-CoA hydratase3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase (Schrader *et al.*, 1996; Winrow *et al.*, 1998), le fibrinogène β (Chauvet *et al.*, 2005), la 5-lipoxygénase (Steinhilber *et al.*, 1995; Schrader *et al.*, 1996), l' α -fœtoprotéine (Bois-Joyeux *et al.*, 2000), la CRBP-I (Schrader *et al.*, 1996) et la protéine p21^{Waf-1/Cip-1} (Schrader *et al.*, 1996).

I.5. Rôles physiologiques de ROR α , un récepteur aux fonctions multiples

Les fonctions physiologiques du récepteur nucléaire ROR α ont, pour la plupart, été caractérisées grâce à l'analyse du phénotype de souris dont le gène *Rora* est invalidé: les souris homozygotes pour l'allèle *staggerer* (du verbe anglais *to stagger*: tituber).

La souris *staggerer* est un mutant naturel apparu spontanément en 1955 dans un élevage de souris obèses et de fond génétique C57BL/6 du "Jackson Memorial Laboratory" et décrit pour la première fois en 1962 par Sidman, Lane et Dickie (Sidman *et al.*, 1962). Les souris homozygotes pour l'allèle *staggerer* ont initialement été caractérisées par des tremblements, un déséquilibre corporel et une petite taille. De plus, elles montrent une sévère ataxie cérébelleuse due à un défaut de développement des cellules de Purkinje. C'est en 1996 que la mutation *staggerer* a été localisée dans le gène *Rora* (sur le chromosome 9), par le groupe de Lander (Hamilton *et al.*, 1996). Ce résultat a été confirmé un an plus tard par Matysiak-Scholze et Nehls (Matysiak-Scholze et Nehls, 1997). Une délétion de 6,5kb dans la séquence génomique du gène *Rora* résulte en la délétion d'un exon codant la partie aminoterminal du LBD de ROR α . Cette délétion cause un décalage du cadre de lecture au niveau de l'acide aminé 273 de ROR α 1 qui conduit à la création d'un codon stop prématuré 27 acides aminés après. Une telle délétion résulte en un ARN codant une protéine ROR α tronquée, mais qui conserve son domaine de fixation à l'ADN, ce qui conduit à la perte de sa fonction de transactivation. Cependant, l'évaluation semi-quantitative par Northern Blot a montré chez les mutants une forte réduction des ARN messagers délétés *Rora*^{sg} par rapport aux ARN *Rora* sauvages, via un mécanisme de dégradation des ARN *Rora*^{sg} (Hamilton *et al.*, 1996). Ces résultats suggèrent que *staggerer* est un allèle nul.

Deux lignées de souris dépourvues d'un récepteur nucléaire ROR α fonctionnel ont aussi été générées par mutagenèse dirigée en 1998. Dans la première lignée, un vecteur portant le gène *LacZ* codant pour la β -galactosidase remplace de deuxième doigt de zinc du DBD de ROR α (Steinmayr *et al.*, 1998). Dans la deuxième lignée, une cassette portant le gène de résistance à la néomycine codant pour la néomycine phosphotransférase remplace le premier doigt de zinc du DBD de ROR α (Dussault *et al.*, 1998).

Les deux lignées de souris *Rora*^{-/-} ont un phénotype cérébelleux similaire à celui des souris homozygotes pour la mutation *staggerer* (*Rora*^{sg/sg}), ce qui renforce l'hypothèse que la mutation *staggerer* provoque une perte de fonction de la protéine ROR α .

L'étude de modèles cellulaires a aussi permis de révéler l'implication de ROR α dans plusieurs processus physiologiques.

1.5.1. ROR α participe au développement et au vieillissement du cervelet

L'étude de la fonction de ROR α dans le cervelet a été étudiée bien avant l'identification du gène *Rora*. Historiquement, la première fonction physiologique attribuée au gène portant la mutation *staggerer* (gène *Rora*, encore inconnu à l'époque) a été son implication dans le développement du cervelet. ROR α , qui est exprimé très tôt - dès E14 (Steinmayr *et al.*, 1998) dans le cervelet, exerce une fonction majeure dans le développement du cervelet puisque son absence conduit à un phénotype ataxique, phénotype lié à des pertes massives de cellules dans le cervelet. Une description détaillée de la fonction de ROR α dans le développement des cellules cérébelleuses (en particulier les cellules de Purkinje) sera présentée dans le §II.6, ceci par souci de clarté, à la fin de la deuxième partie qui concerne le cervelet et son développement.

De même que les souris *Rora*^{sg/sg}, les souris *Rora*^{-/-} ont des tremblements, un déséquilibre corporel, une ataxie cérébelleuse (due à un défaut de développement des cellules de Purkinje, voir §II.6) et la plupart des mutants homozygotes meurent rapidement après le sevrage (Guastavino, 1983; Dussault *et al.*, 1998; Steinmayr *et al.*, 1998). La capacité des souris *Rora*^{sg/sg} et *Rora*^{-/-} à coordonner leurs mouvements est diminuée, comme l'indique l'augmentation de la fréquence de leurs trébuchements par rapport à des souris sauvages (Steinmayr *et al.*, 1998). Des tests indiquent aussi que leur force musculaire et leur équilibre sont diminués (Steinmayr *et al.*, 1998). De plus, les caractéristiques morphologiques et électrophysiologiques des cellules de Purkinje du cervelet *Rora*^{-/-} sont indistinguables de celles des souris *Rora*^{sg/sg} (Dussault *et al.*, 1998; Steinmayr *et al.*, 1998; Doulazmi *et al.*, 2001).

Le cervelet de ces souris est de taille nettement inférieure à celui de souris sauvages (voir figure 13). Cette atrophie du cervelet est liée à la neurodégénérescence des cellules de Purkinje ainsi qu'à l'absence de la quasi-totalité des cellules granulaires (Sidman *et al.*, 1962; Sotelo et Changeux, 1974; Landis et Sidman, 1978; Herrup, 1983; Zanjani *et al.*, 1990; Steinmayr *et al.*, 1998).

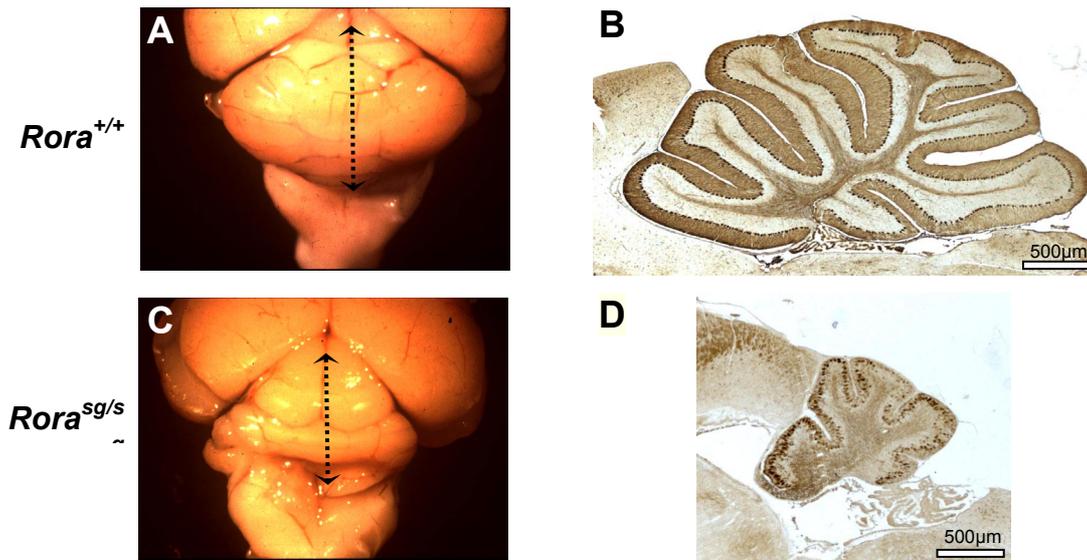


Figure 13: Atrophie cérébelleuse chez le mutant $Rora^{sg/sg}$. A-B: cervelet de souris adulte $Rora^{+/+}$. C-D: cervelet de souris adulte $Rora^{sg/sg}$. B, D: Coupe parasagittale dans le vermis (au niveau de la flèche dans la photo A et C respectivement). La couche des cellules de Purkinje est révélée (en marron) à l'aide d'un anticorps anti-calbindine.

Alors qu'environ 80% des cellules de Purkinje ont dégénéré chez les mutants, les cellules de Purkinje restantes sont immatures, ectopiques, et présentent des anomalies de différenciation (voir §II.7.2). Par ailleurs, bien que la morphologie du cervelet des souris hétérozygotes $Rora^{+sg}$ apparaisse normale, une perte significative des cellules de Purkinje du cervelet et une atrophie des dendrites des cellules survivantes ont lieu au cours du vieillissement (Doulazmi *et al.*, 1999; Hadj-Sahraoui *et al.*, 2001). La perte des cellules de Purkinje au cours du vieillissement est plus précoce chez les mâles que chez les femelles, indiquant une influence des hormones sexuelles (Doulazmi *et al.*, 1999). De plus, les souris $Rora^{+sg}$ ont un comportement moteur anormal (Caston *et al.*, 1995; Caston *et al.*, 2004).

Ces résultats suggèrent que ROR α joue un rôle neuroprotecteur lors du développement et du vieillissement. ROR α contrôle l'expression de la protéine PCP-2

(Matsui, 1997), protéine abondamment exprimée dans les cellules de Purkinje, mais l'absence de PCP-2 dans le cervelet du mutant *staggerer* (Hamilton *et al.*, 1996; Gold *et al.*, 2003) ne semble pas être responsable de la dégénérescence observée. En effet, la souris invalidée pour *Pcp-2* ne présente pas d'anomalie cérébelleuse (Mohn *et al.*, 1997). Les fonctions de PCP-2 ne sont pas connues, mais le phénotype des souris invalidées pour ce gène indique que le gène *Pcp-2* n'est pas indispensable à la survie des cellules de Purkinje, ou indique l'existence d'une compensation de sa fonction chez la souris délétée pour ce gène.

1.5.2. ROR α et métabolisme de l'os et du cartilage

Le rôle de ROR α dans le contrôle du métabolisme de l'os a été mis en évidence grâce à l'utilisation de modèles cellulaires et à l'analyse du phénotype de souris *Rora*^{sg/sg} (Meyer *et al.*, 2000). L'os est un tissu organisé au métabolisme actif. La formation et le remodelage de l'os font partie d'un système homéostatique intégré dans lequel les ostéoblastes jouent un rôle central. Les ostéoblastes sécrètent la matrice organique qui sera ensuite minéralisée. Cette matrice est composée de fibres de collagène de type I et d'autres protéines comme la BSP (*Bone SialoProtein*), l'ostéopontine et l'ostéocalcine. Les ostéoblastes sont issus de la différenciation de cellules souches mésenchymateuses (MSCs/*Mesenchymal Stem Cells*) qui sont des cellules multipotentes présentes dans la moelle osseuse. Le transcrit *Rora* et la protéine ROR α ont été détectés dans des MSCs humaines. Le taux de transcrit *Rora* est augmenté dans les MSCs humaines au cours de la différenciation en ostéoblastes. La fonction de ROR α dans l'os a été caractérisée par une étude montrant que les souris *Rora*^{sg/sg} ont des os plus fins que les souris *Rora*^{+/+}. De plus, le contenu minéral du tibia des souris *Rora*^{sg/sg} est plus faible que celui des souris *Rora*^{+/+}. Le phénotype osseux des souris *Rora*^{+/-sg} est identique à celui des *Rora*^{+/+} (Meyer *et al.*, 2000), du moins chez les adultes jeunes. Ces résultats indiquent que les souris *Rora*^{sg/sg} ont des os ostéopéniques et suggèrent un rôle de ROR α dans le contrôle du métabolisme de l'os et dans la protection contre l'ostéoporose.

Le mécanisme d'action de ROR α dans l'os n'est pas encore élucidé. Cependant, des résultats indiquent que ce récepteur nucléaire participe au contrôle de la transcription des gènes codant pour la BSP et l'ostéocalcine, deux protéines importantes pour la formation du tissu osseux (voir §1.4).

De plus, ROR α est présent dans le cartilage articulaire de rat. L'interleukine 1 β , qui est impliquée dans la dégradation du cartilage, provoque une augmentation du taux de

transcrit et de protéine ROR α dans des chondrocytes de rat en culture primaire (Bordji *et al.*, 2000). Ces résultats suggèrent un rôle de ROR α dans le métabolisme du cartilage articulaire.

1.5.3. ROR α , modulateur de l'immunité et de la réaction inflammatoire

Le récepteur nucléaire ROR α est fortement impliqué dans le fonctionnement du système immunitaire. En effet, le développement du thymus des souris *Rora*^{sg/sg} est retardé par rapport à celui des souris *Rora*^{+/+}, leur rate est plus petite et leurs ganglions lymphatiques sont plus grands par rapport à ceux des souris *Rora*^{+/+} (Trenkner et Hoffmann, 1986). La formation de lymphocytes T helpers apparaît normale chez les souris *Rora*^{sg/sg}. Cependant, la mutation *staggerer*, à l'état homozygote, entraîne une anomalie de genèse des cellules suppressives et dans la terminaison des réponses immunitaires engageant des lymphocytes T (Trenkner et Hoffmann, 1986).

Plusieurs observations mettent en évidence une action anti-inflammatoire de ROR α . Les macrophages de souris *Rora*^{sg/sg} traités *in vitro* par différents immuno-modulateurs (LPS/acide *lipopolysaccharide*; ou N-acétylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine, MDP; ou N-acétylmuramyl-L-alanyl-D-glutamine-O-n-butyl, murabutide) ont de plus forts taux d'induction du transcrit codant pour l'interleukine 1 β que les macrophages de souris *Rora*^{+/+} ayant subi le même traitement (Kopmels *et al.*, 1992). Un même effet différentiel du LPS entre les souris *Rora*^{sg/sg} et les souris *Rora*^{+/+} a aussi été observé sur le taux des transcrits codant pour l'interleukine 1 α et le TNF α (*Tumor Necrosis Factor α*). De plus, une production anormalement élevée d'IL-1 β (interleukine 1 β) a aussi été observée dans le cerveau de souris après traitement périphérique au LPS (Vernet-der Garabedian *et al.*, 1998). Une inflammation exacerbée dans le poumon a également été décrite chez les souris *Rora*^{sg/sg} après traitement au LPS (Stapleton *et al.*, 2005).

L'action anti-inflammatoire de ROR α est aussi caractérisée par sa capacité à inhiber la réponse inflammatoire dans les cellules de muscle lisse vasculaire (VSMCs/*Vascular Smooth Muscle Cells*) (Delerive *et al.*, 2001). Cette action repose sur l'effet transactivateur de ROR α sur le gène codant pour I- κ B α (voir §I.4), l'inhibiteur du facteur de transcription NF- κ B. Ainsi, la surexpression de ROR α 1 dans des cellules humaines de muscle lisse inhibe la réponse inflammatoire provoquée par un traitement par le TNF α , notamment l'augmentation

des taux d'interleukines IL-6 et IL-8 et de cyclooxygénase-2 (COX-2). De plus, les souris *Rora*^{sg/sg} ont des taux de transcrits *I- κ B α* dans l'aorte plus faibles que les souris *Rora*^{+/+}, ce qui indique que ROR α contrôle *in vivo* l'expression du gène codant pour I- κ B α .

L'expression de ROR α est elle-même contrôlée par certaines cytokines ou immunomodulateurs. En effet, un traitement par l'interleukine 1 β , le TNF α ou le LPS provoque l'augmentation du taux de transcrit *Rora* dans des cellules de muscle lisse aortique en culture (Besnard *et al.*, 2002b). Cet effet semble être spécifique du type cellulaire, parce qu'un traitement par le TNF α provoque une diminution du taux de transcrit *Rora* dans des préadipocytes DA et 3T3-L1 (Austin *et al.*, 1998; Kurebayashi *et al.*, 2001).

Les résultats présentés ici mettent en évidence une action anti-inflammatoire de ROR α et indiquent que ce récepteur nucléaire pourrait contribuer à la prévention de maladies inflammatoires chroniques comme l'athérosclérose.

1.5.4. ROR α , métabolisme lipidique et athérosclérose

L'utilisation de modèles cellulaires permettant d'étudier la différenciation adipocytaire (cellules 3T3-L1 préadipocytes D1) a permis de montrer que le taux du transcrit *Rora* est augmenté au cours de la différenciation adipocytaire (Austin *et al.*, 1998; Kurebayashi *et al.*, 2001). De plus, le TGF β 1 (*Transforming Growth Factor β 1*) et le TNF α , cytokines connues pour inhiber la différenciation adipocytaire, provoquent une diminution du taux de transcrit *Rora* dans les préadipocytes D1 (Austin *et al.*, 1998). Ces résultats suggèrent un rôle de ROR α dans la régulation des gènes au cours de la différenciation adipocytaire.

Par ailleurs, la mutation *staggerer* a été associée à plusieurs aspects de la pathogénicité de l'athérosclérose comme l'inflammation (voir §1.5.3) et le métabolisme lipidique. Comme nous en avons discuté dans le § 1.4, ROR α contrôle la transcription des gènes codant pour les apolipoprotéines A-I et C-III, ce qui suggère un rôle de ce récepteur nucléaire dans la régulation du métabolisme des triglycérides et des lipoprotéines. En effet, l'apoA-I est le constituant majeur des HDLs (*High Density Lipoproteins*) et l'apoC-III entre dans la composition des HDLs et des lipoprotéines riches en triglycérides. Les souris *Rora*^{sg/sg} ont des taux de triglycérides plasmatiques réduits par rapport aux souris *Rora*^{+/+} (Raspe *et al.*, 2001). Cette caractéristique est associée à une diminution de la production hépatique d'apoC-III et des concentrations plasmatiques en apoC-III (Raspe *et al.*, 2001). Ceci suggère un rôle

de ROR α dans le métabolisme des triglycérides. La diminution des taux plasmatiques de HDLs chez la souris *Rora*^{sg/sg} par rapport à la souris *Rora*^{+/+} est associée à une diminution de l'expression du gène de l'apoA-I dans l'intestin et à une diminution des concentrations plasmatiques en apoA-I et apoA-II (Mamontova *et al.*, 1998). De plus, la diminution des taux plasmatiques de cholestérol sous forme de HDL due à l'hypoalphalipoprotéïnémie est fortement corrélée à une augmentation des lésions athérosclérotiques chez les souris *Rora*^{sg/sg} par rapport aux souris *Rora*^{+/+} lorsqu'elles sont soumises à un régime athérogène riche en graisses (Mamontova *et al.*, 1998). Par ailleurs, le taux de transcrit *Rora* est diminué dans des plaques athérosclérotiques humaines par rapport à des artères mammaires dépourvues d'athérosclérose (Besnard *et al.*, 2002b).

Ces résultats montrent une action protectrice de ROR α contre l'athérosclérose, probablement due en partie à une augmentation de l'alphalipoprotéïnémie et à une distribution préférentielle du cholestérol dans les HDLs, mais aussi à un rôle anti-inflammatoire (voir figure 14). Il est intéressant de rappeler à ce sujet que le ligand naturel de ROR α est très probablement le cholestérol ou l'un de ses dérivés. Le cholestérol stimulerait donc lui-même *via* ROR α son adressage aux HDLs (pour revue, voir Boukhtouche *et al.*, 2004). Des études supplémentaires sont nécessaires pour élucider le mécanisme de cette boucle de régulation très récemment mise à jour.

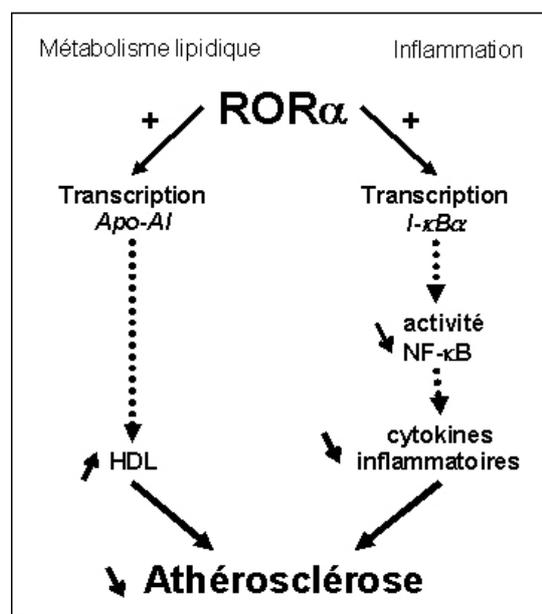


Figure 14: Mécanisme du rôle protecteur de ROR α contre l'athérosclérose.

Adapté de Boukhtouche *et al.*, 2004.

1.5.5. ROR α , angiogenèse et système vasculaire

Le rôle de ROR α dans l'angiogenèse a été mis en évidence par la comparaison de l'effet d'une ischémie induite par ligature de l'artère fémorale entre les souris *Rora*^{sg/sg} et les souris *Rora*^{+/+} (Besnard *et al.*, 2001). Chez les souris *Rora*^{+/+}, la ligature de l'artère fémorale provoque une augmentation rapide et transitoire du taux de transcrits *Rora* dans le tissu ischémique. L'angiogenèse post-ischémique causée par la ligature de l'artère fémorale a été évaluée dans les pattes postérieures par microangiographie, mesure de la densité en capillaires par immunohistochimie avec un anticorps anti-CD31 et mesure du flux sanguin par imagerie laser Doppler. Les résultats indiquent que l'angiogenèse post-ischémique est beaucoup plus importante chez les souris *Rora*^{sg/sg} que chez les souris *Rora*^{+/+}. De plus, le taux de la protéine eNOS (*endothelial Nitric Oxide Synthase*) est plus fort dans le tissu ischémique des souris *Rora*^{sg/sg} que dans celui des souris *Rora*^{+/+}. L'oxyde nitrique (NO) est un effecteur de l'angiogenèse en aval de VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*). Contrairement à l'eNOS, le taux de l'interleukine anti-angiogénique IL-12 est plus faible dans le tissu ischémique des souris *Rora*^{sg/sg} que dans celui des souris *Rora*^{+/+}. Aucune modification de VEGF, le principal effecteur de l'angiogenèse, n'a été observée dans ces conditions expérimentales. L'ensemble de ces résultats met en évidence un rôle anti-angiogénique de ROR α .

De plus, une étude indique que ROR α participe au contrôle du tonus vasculaire des artères mésentériques (Besnard *et al.*, 2002a). La pression artérielle moyenne est plus faible chez les souris *Rora*^{sg/sg} que dans celui des souris *Rora*^{+/+} et elle augmente moins fortement en réponse à un traitement vasoconstricteur.

1.5.6. ROR α participe à la myogenèse

ROR α ne participe pas seulement à la différenciation des cellules de muscle lisse. Ce récepteur nucléaire est aussi impliqué dans le contrôle de la différenciation du muscle squelettique, comme le montrent les résultats d'une étude *in vitro* fondée sur l'utilisation de la lignée de cellules myogéniques C2C12 (Lau *et al.*, 1999). ROR α est constitutivement exprimé lors de la différenciation (provoquée par un retrait du sérum du milieu de culture) des myoblastes C2C12 proliférants en myotubes multinucléés post-mitotiques ayant acquis un phénotype contractile. La surexpression de manière stable dans les cellules C2C12 d'une

protéine ROR α 1 dépourvue de la région E et d'une partie de la région D (ROR α 1(1-235)) provoque un retard de différenciation et une diminution de la taille des myotubes, associés à un retard dans l'immunodétection de la chaîne lourde de la myosine. Cette diminution de la capacité des cellules à se différencier est aussi associée à la diminution du taux de transcrits codant pour MyoD, myogénine et p21^{Waf-1/Cip-1}. MyoD et myogénine sont des facteurs de transcription spécifiques du muscle appartenant à la famille bHLH (*basic Helix-Loop-Helix*) et participant à l'inhibition de la prolifération, à l'activation de la différenciation et à l'acquisition du phénotype contractile. p21^{Waf-1/Cip-1} est un inhibiteur de cdk (*cyclin dependant kinase*) qui est impliqué dans la sortie du cycle cellulaire. De plus, ROR α 1 interagit physiquement avec MyoD et son co-activateur p300/CBP. L'interaction entre ROR α et MyoD nécessite le domaine d'activation amino-terminal de MyoD et le domaine de liaison à l'ADN de ROR α .

Il est intéressant de remarquer que les souris *Rora*^{sg/sg} et *Rora*^{-/-} ont une force musculaire plus faible que les souris *Rora*^{+/+} comme l'indiquent les résultats de tests consistant à mesurer le temps que les souris sont capables de rester suspendues à une barre par leurs pattes antérieures (Steinmayr *et al.*, 1998). Par ailleurs, le taux du transcrit *Rora* est augmenté au cours de la différenciation des cellules myoblastiques de rat L6 (Delerive *et al.*, 2002).

Ces résultats indiquent que ROR α régule positivement la myogenèse et pourrait participer à la protection contre l'atrophie musculaire.

1.5.7. ROR α et cancérogenèse

ROR α interagit physiquement *in vitro* avec la kinase suppresseur de tumeur NM23, connue pour son rôle dans l'organogenèse et la différenciation (Paravicini *et al.*, 1996). L'expression de NM23 est inversement corrélée au potentiel métastatique. Ces résultats suggèrent un rôle de ROR α dans la cancérogenèse. Cependant, la signification physiologique de l'interaction entre ROR α et NM23 reste à établir.

N-Myc est un membre d'une famille de protéines nucléaires qui sont les produits de trois gènes bien caractérisés *c-myc*, *N-myc*, et *L-myc* qui possèdent une activité oncogénique. La dérégulation de l'expression de chacun de ces gènes est impliquée dans la genèse ou la progression de tumeurs. Les trois gènes *myc* sont capables de transformer des cellules en

culture, en coopération avec *Ha-ras* activé. *N-myc* s'exprime dans l'embryon en développement et est essentiel pour une organogenèse normale. *N-myc* ne s'exprime pas dans les tissus adultes normaux, mais de forts taux de transcrits *N-myc* ont été détectés dans des tumeurs d'origine neuroendocrine et embryonnaire. L'expression du proto-oncogène *N-myc*, mesurée par sa capacité à transformer des fibroblastes embryonnaires de rat en présence de *Ha-ras* activé, est augmentée en réponse à la surexpression de ROR α 1 (Dussault et Giguere, 1997). Ceci suggère un rôle stimulateur de ROR α sur l'initiation ou la progression de certaines néoplasies.

Jusqu'à présent, l'analyse du phénotype des souris *Rora*^{sg/sg} n'a pas permis de mettre en évidence un rôle direct de ROR α dans la cancérogenèse. Cependant les résultats décrits ci-dessus indiquent que ROR α pourrait participer à la cancérogenèse dans certaines conditions. L'évaluation du niveau d'implication de ROR α dans un tel processus serait très utile à une meilleure compréhension du rôle de ce récepteur nucléaire.

1.5.8. ROR α et hypoxie

ROR α est un facteur de transcription dont l'expression est modulée par l'hypoxie (Chauvet *et al.*, 2004). L'hypoxie fait référence à une concentration d'oxygène en dessous de la normale dans l'air, le sang ou le tissu. Un stress hypoxique va conduire à une réponse adaptative cellulaire. Les facteurs les plus importants dans la réponse cellulaire à l'hypoxie sont les facteurs de transcription HIFs (*Hypoxia Inducible Factor*), qui relaient les effets transcriptionnels de l'hypoxie (Wang et Semenza, 1993a, b).

Dans les cellules d'hépatomes humains HepG2 et HepB3 et des hépatocytes de rat en culture primaire, il a été montré que le taux du transcrit *Rora* est augmenté par l'hypoxie. De plus, la desferriamine, un composé chimique qui mime les effets de l'hypoxie, induit une augmentation du taux de protéine ROR α 4 dans les cellules HepG2, et des expériences de transfection et d'expression transitoire dans ces cellules indiquent qu'un stress hypoxique augmente l'activité transcriptionnelle de ROR α . De plus, le facteur de transcription HIF-1 se lie spécifiquement à son élément de réponse présent dans le promoteur du gène *Rora* humain. HIF-1 stimule spécifiquement l'activité transcriptionnelle du promoteur *hRora1* via le HRE (Chauvet *et al.*, 2004): ROR α est donc un gène cible de HIF-1.

La fonction physiologique de ROR α dans la réponse à l'hypoxie n'a cependant pas été identifiée.

1.5.9. ROR α et rythmes circadiens

En plus des anomalies motrices liées à l'ataxie cérébelleuse due à la perte des cellules de Purkinje du cervelet, les souris homozygotes *staggerer* présentent des anomalies de l'activité motrice circadienne (Sato *et al.*, 2004). Bien que ces souris présentent des rythmes circadiens, la longueur des périodes circadiennes d'activité est réduite.

Les rythmes circadiens sont des cycles journaliers qui concernent plusieurs aspects de la physiologie et du comportement, tels que l'activité motrice, et qui sont contrôlés par un oscillateur endogène qui agit par période de 24 heures et qui définit "l'horloge circadienne". La rythmicité circadienne est gouvernée par le noyau suprachiasmatique, dans l'hypothalamus ventral. Les acteurs moléculaires de l'horloge circadienne centrale sont principalement les complexes protéiques PER/CRY, BMAL1/CLOCK, et les récepteurs nucléaires ROR α et Rev-Erb α . Deux boucles de régulation interactives sont la caractéristique principale du mécanisme d'horloge circadienne. La première boucle, qui implique les complexes BMAL1/CLOCK et PER/CRY (voir figure 15), serait responsable de l'amplitude et de la durée des périodes (Reppert et Weaver, 2002; Emery et Reppert, 2004). La seconde boucle, qui implique le complexe BMAL1/CLOCK et les récepteurs nucléaires ROR α et Rev-Erb α , serait impliquée dans la régulation fine, assurant la stabilité du système lorsque les conditions environnementales varient (Emery et Reppert, 2004).

Les facteurs ROR α et Rev-Erb α se lient en monomère et de façon compétitive sur le même élément de réponse RORE dans le promoteur de *Bmall* (Guillaumond *et al.*, 2005; Ueda *et al.*, 2005; voir figure 15). Ainsi, l'oscillation de *Bmall* est la conséquence de la transactivation par ROR α qui entre en compétition avec la trans-répression par Rev-Erb α . L'expression de Rev-Erb α est rythmique, et cette rythmicité semble être régulée directement par les hétérodimères CLOCK/BMAL1, ce qui relie les deux voies de régulation (Preitner *et al.*, 2002; Ueda *et al.*, 2002). Le complexe CLOCK/BMAL1 semble réguler également l'expression de ROR α (Sato *et al.*, 2004).

Un niveau de régulation supplémentaire est lié au contrôle de l'expression de *Rev-erb α* : ROR α est capable d'activer sa transcription alors que Rev-Erb α lui-même réprime sa propre transcription (Adelmant *et al.*, 1996; Delerive *et al.*, 2002). Ce niveau supplémentaire de régulation peut augmenter encore la stabilité du système.

Ainsi, ROR α n'est pas nécessaire à la genèse des rythmes circadiens, mais influence la longueur des périodes et la stabilité de l'horloge circadienne: en effet, ROR α intervient dans la régulation fine et la stabilisation des rythmes circadiens, via la régulation - en compétition avec Rev-Erb α - de l'activation transcriptionnelle du gène *Bmal1*, dont le produit protéique est un acteur central de la régulation de la rythmicité circadienne.

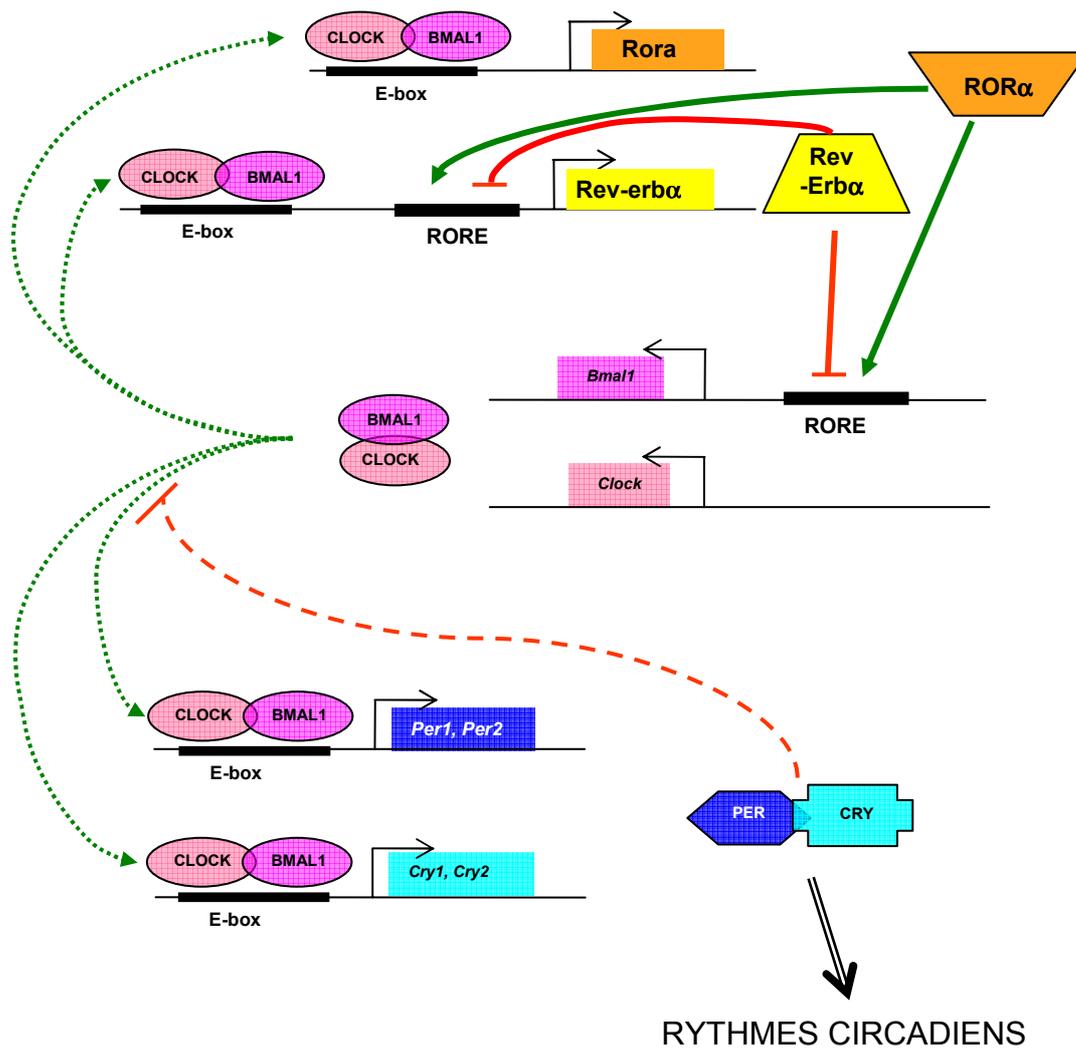


Figure 15: Régulation de l'expression des acteurs moléculaires du rythme circadien chez les mammifères. Les traits verts indiquent une activation de la transcription et les traits rouges indiquent une répression de l'activité transcriptionnelle.

Pour conclure cette partie consacrée à la fonction de ROR α , il est intéressant de remarquer que ROR α n'a pas une mais de nombreuses fonctions (figure 16). En effet, l'ensemble des résultats indique que ROR α participe au processus de différenciation de types cellulaires de diverses origines et semble avoir un rôle protecteur dans les processus liés à l'âge, notamment contre le vieillissement du cerveau, les immunodéficiences, l'ostéoporose, l'athérosclérose et l'atrophie musculaire. Certains processus dans lesquels ROR α est impliqué sont connectés entre eux et participent de concert au développement de diverses pathologies. C'est le cas de l'inflammation et du métabolisme lipidique qui sont des éléments clés de l'athérosclérose (Libby, 2002). C'est aussi le cas de l'inflammation et de l'hypoxie qui sont deux stimuli impliqués dans l'angiogenèse (Carmeliet, 2000). ROR α apparaît donc comme l'élément central d'un ensemble de processus physiologiques et pathologiques.

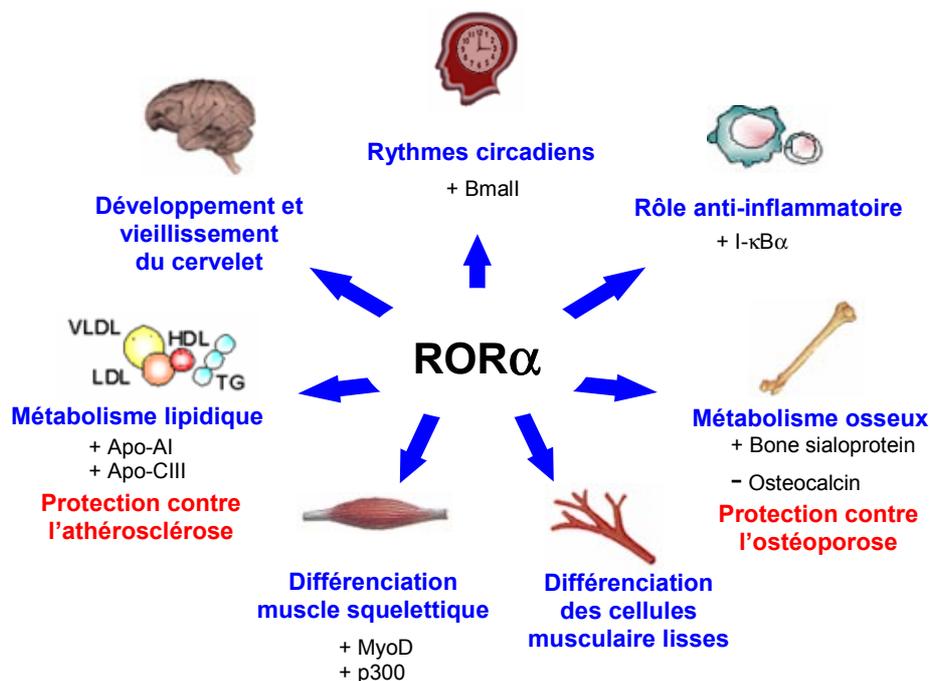


Figure 16: Rôles physiologiques de ROR α .

Le schéma représente les processus biologiques dans lesquels ROR α est impliqué ainsi que certains gènes cibles de ROR α participant à ces processus. " + " indique une stimulation de l'expression du gène, alors que " - " indique une répression. Adapté de Boukhtouche *et al.*, 2004.

II. SURVIE & DIFFERENCIATION DES CELLULES DE PURKINJE DU CERVELET

II.1. Anatomie générale du cervelet et fonction

Le cervelet, structure médiane et impaire du système nerveux central, est situé en position caudale par rapport aux hémisphères, en arrière du toit optique (colliculi), sur la face postérieure du tronc cérébral auquel il est relié par les pédoncules cérébelleux, par lesquels transitent l'ensemble des afférences et efférences.

Le cervelet contient plus de la moitié des neurones du cerveau alors qu'il ne constitue que le dixième de son volume (Kandel *et al.*, 1991).

Le cervelet est une structure extrêmement foliée (figure 17). Dans le sens antéro-postérieur, il est composé de trois lobes: le lobe antérieur et le lobe postérieur séparés par la fissure primaire et le lobe flocculo-nodulaire séparé du lobe postérieur par la fissure postéro-latérale. L'ensemble de ces lobes est également subdivisé en dix lobules numérotés depuis l'avant de I à X.

Suivant l'axe médio-latéral, trois régions sont distinguées: deux fissures longitudinales isolent, au centre, le vermis médian des deux hémisphères latéraux; ces derniers peuvent se diviser en région intermédiaire (appelée également paravermis) et latérale.

Si l'on examine le cervelet de façon centripète, ce dernier est alors composé d'une couche de substance grise superficielle appelée cortex cérébelleux (voir §II.1.1), d'une substance blanche (essentiellement formée par des fibres constituées par les axones des cellules de Purkinje et des fibres de projection des voies afférentes; voir §II.1.2) et enfin, d'une masse cellulaire située au cœur de la substance blanche, les noyaux profonds (voir §II.1.4).

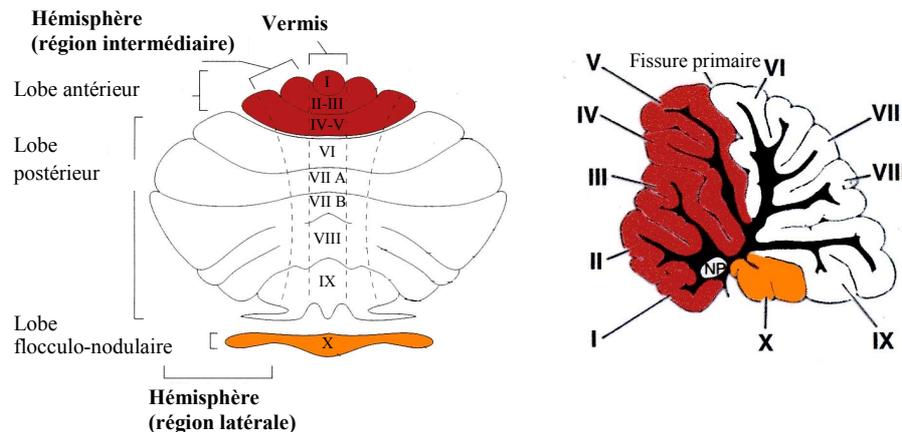


Figure 17: Anatomie du cervelet. Le cervelet est composé de dix lobules (de I à X) et trois lobes (lobe antérieur rouge, lobe postérieur gris et lobe flocculo-nodulaire orange). Sur une coupe parasagittale (droite), on distingue le cortex cérébelleux, la substance blanche (noir) et les noyaux profonds (NP). D'après Fox et Snider, 1967; Kandel *et al.*, 1991.

Le rôle principal du cervelet concerne la coordination, la précision et l'harmonie des mouvements (Brooks et Thach, 1981; Ito, 1982). Le cervelet a également été impliqué dans des apprentissages moteurs mettant en jeu l'équilibre et la coordination du mouvement, les apprentissages spatiaux, les émotions et même le langage (pour revue, voir Rondi-Reig *et al.*, 2000). Le cervelet reçoit des afférences du cortex moteur, des récepteurs cutanés proprioceptifs, tactiles, visuels et auditifs et même des récepteurs viscéraux, ce qui lui donne un rôle important dans la cognition (Crispino et Bullock, 1984; Bauman et Kemper, 1985; Arin *et al.*, 1991). Les pathologies liées au cervelet donnent lieu à une hypotonie, une ataxie et un tremblement au cours de l'action (Kandel *et al.*, 1991).

Le cervelet reçoit à la fois des afférences des structures motrices impliquées dans la planification du mouvement et des efférences proprioceptives le renseignant sur la réalisation du mouvement ce qui suggère qu'il agit comme un "comparateur". Il peut alors contrôler le mouvement grâce à ses projections vers les systèmes moteurs descendants du cerveau.

II.1.1. Structure du cortex cérébelleux

Le cortex cérébelleux, structure simple et homogène, suit, parallèlement à la surface, les sillons et circonvolutions du cervelet (figure 18). Le cortex cérébelleux contient principalement cinq types de neurones: les cellules de Purkinje, les grains, les cellules étoilées, les cellules en corbeille et les cellules de Golgi. Les neurones du cortex cérébelleux sont répartis en trois couches cellulaires: de la surface jusqu'à la partie la plus profonde, on

distingue la couche moléculaire, la couche des cellules de Purkinje et la couche granulaire interne. Enfin, le cortex cérébelleux ne reçoit que trois types d'afférences: les fibres grimpantes, les fibres moussues et les fibres monoaminergiques.

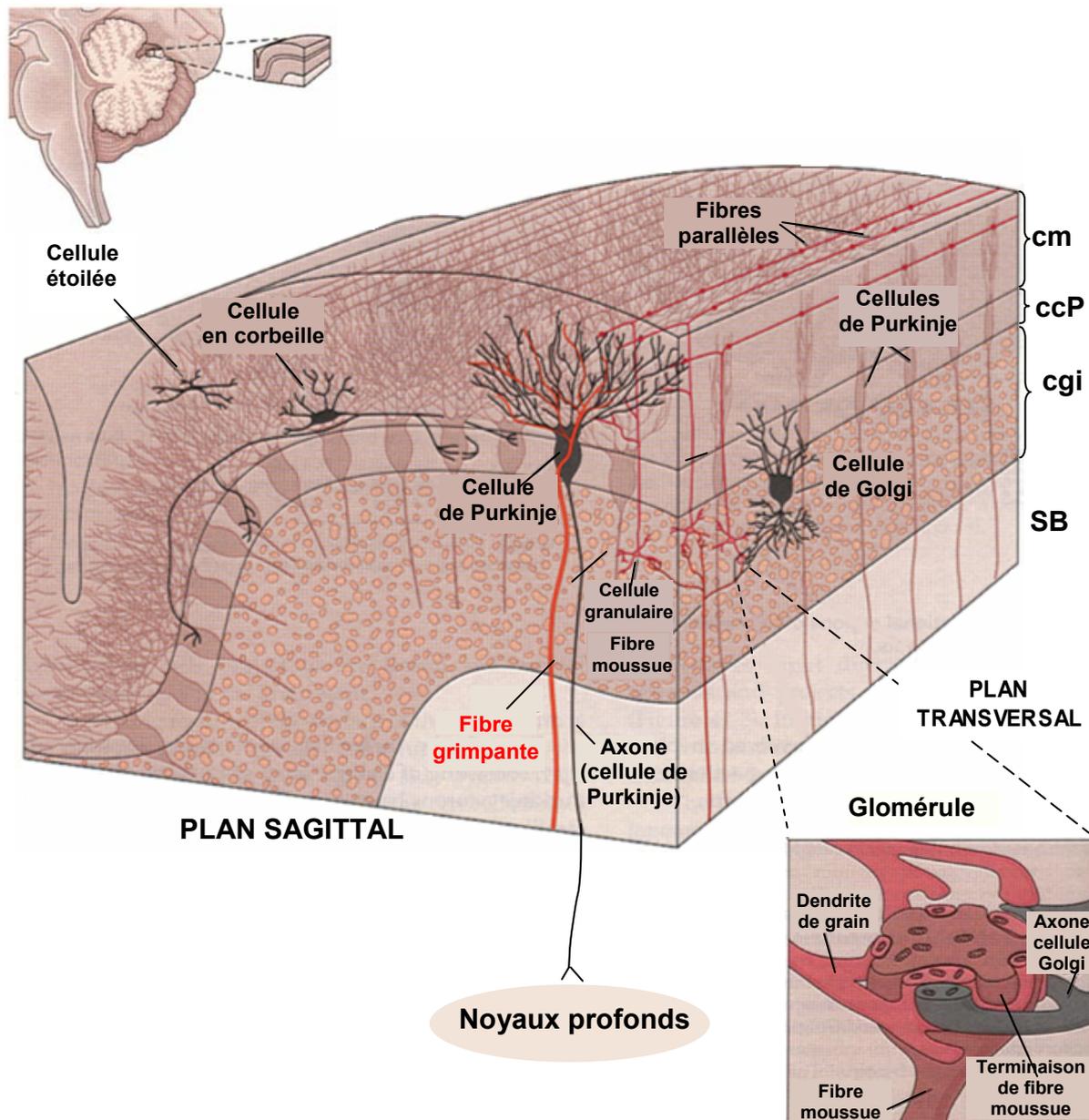


Figure 18: Organisation cytoarchitectonique du cervelet. Le cortex regroupe la couche moléculaire (cm), la couche des cellules de Purkinje (ccP) et la couche granulaire interne (cgi), et il contient cinq types principaux de neurones, les cellules de Purkinje, les cellules en corbeille, les cellules étoilées, les cellules granulaires, les cellules de Golgi. Les deux types principaux d'afférences corticales sont représentés, les fibres moussues et les fibres grimpantes. SB: substance blanche.

En encart: Représentation schématique de l'organisation d'un glomérule.

II.1.1.1. Les couches cellulaires du cortex cérébelleux

La couche moléculaire contient deux types d'interneurones, les cellules en corbeille et les cellules étoilées, les axones (fibres parallèles) des grains, les terminaisons axonales des neurones olivaires (fibres grimpantes) et l'arborisation dendritique des cellules de Purkinje.

La couche des cellules de Purkinje contient en monocouche les somas des cellules de Purkinje.

La couche granulaire interne contient les somas des grains et une partie de leur axone, les cellules de Golgi et les terminaisons des fibres moussues.

II.1.1.2. Les neurones du cortex cérébelleux

La cellule de Purkinje, originellement décrite par le physiologiste tchèque Johannes Purkinje en 1837, est l'élément central du réseau synaptique cortical cérébelleux. En effet, les interneurones de la couche moléculaire, cellules étoilées et en corbeille, ainsi que les cellules des grains de la couche granulaire interne se projettent majoritairement sur les cellules de Purkinje. Les cellules de Purkinje sont parmi les neurones les plus volumineux du système nerveux; le diamètre de leur soma, d'aspect ovoïde, mesure environ 20µm (Caddy et Herrup, 1990) chez la souris.

L'arbre dendritique, émergeant du soma, est très organisé et s'étale sur 300 à 400 micromètres de largeur dans le plan sagittal (figure 19), mais son épaisseur dans le plan transversal n'est que de 15 à 20 micromètres, donc du même ordre que le diamètre du corps cellulaire. Un, ou parfois deux, troncs dendritiques principaux s'élèvent directement du pôle apical de la cellule, donnant quelques troncs dendritiques primaires qui se ramifient eux-mêmes en au moins deux dendrites secondaires réparties plus ou moins parallèlement à la surface du folia. Ces troncs secondaires donnent naissance

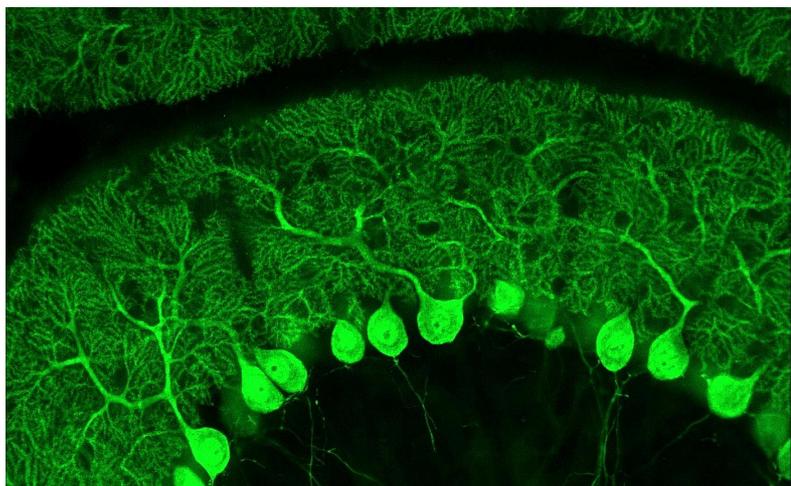


Figure 19: Cellules de Purkinje adultes. Les cellules de Purkinje (vert) sont immunomarquées à l'aide d'un anticorps anti-calbindine. *Contribution personnelle.*

à de multiples arborisations tertiaires qui s'étendent dans toute l'épaisseur de la couche moléculaire. Enfin, d'innombrables branchettes terminales se détachent des branches tertiaires, si bien que l'on pourrait reconnaître jusqu'à 7 ordres de ramifications dendritiques (Berry et Bradley, 1976; Berry *et al.*, 1980). Les branchettes terminales sont couvertes de milliers d'épines dendritiques, d'où leur qualificatif de branchettes épineuses (Ramón y Cajal, 1891). Ces épines distales contactent les fibres parallèles. D'autres épines, plus larges, et possédant un pédoncule plus court, sont présentes à la surface des branches dendritiques principales et de la partie apicale du perikaryon (Larramendi et Victor, 1967; Palay et Chan-Palay, 1974): localisées dans la zone dendritique proximale, elles forment des contacts avec une fibre grimpanche.

L'axone des cellules de Purkinje émerge de la région basale du corps cellulaire et plonge dans la couche des grains (il est alors myélinisé) où il abandonne des collatérales qui entrent en contact avec des cellules de Purkinje voisines. Seule efférence du cortex cérébelleux, cet axone rejoint ensuite la substance blanche pour se projeter vers les neurones des noyaux profonds du cervelet, ou en dehors du cervelet au niveau des noyaux vestibulaires pour les cellules de Purkinje du lobe flocculo-nodulaire. Les cellules de Purkinje sont des neurones inhibiteurs GABAergiques.

Les grains, ou cellules granulaires, sont des neurones de petit soma d'environ 5µm. Leur nombre - environ 25-30 millions chez la souris (Zanjani *et al.*, 1994) - et leur densité sont extrêmement grands. Les grains sont le type cellulaire prédominant : cette population neuronale représente 80% des neurones dans le cervelet des rongeurs (Palay et Chan-Palay, 1974). L'axone des grains remonte le cortex cérébelleux dans le plan frontal (perpendiculairement à l'arbre dendritique des cellules de Purkinje) et se divise en deux dans la couche moléculaire (forme caractéristique en forme de T de l'axone). Ainsi, chaque fibre parallèle peut contacter de nombreuses cellules de Purkinje. L'arbre dendritique des grains comporte 3 à 5 dendrites qui font synapse avec les fibres moussues dans les glomérules, structures particulières situées dans la couche interne des grains (voir figure 18). Les grains sont donc le relais de l'information apportée par les fibres moussues. Les grains sont des neurones excitateurs glutamatergiques.

Le cortex cérébelleux contient aussi des **interneurones**. Les principaux sont les cellules de Golgi, les cellules étoilées et en corbeille qui sont des neurones inhibiteurs. Les cellules de Golgi, localisées dans la couche des grains, reçoivent des afférences excitatrices des grains et des collatérales des fibres moussues. Ils modulent, par le biais des glomérules, la synapse fibre moussue - grain. Les cellules en corbeille et étoilées sont localisées dans la couche moléculaire et inhibent les cellules de Purkinje.

Il existe également d'autres cellules, dont la fonction est encore peu connue: **les cellules de Lugaro** (Laine et Axelrad, 1998), **les cellules candélabres** (Laine et Axelrad, 1994) et **les cellules unipolaires en brosse** (Harris *et al.*, 1993; Mugnaini et Floris, 1994; Dino *et al.*, 2000) .

Enfin, de nombreuses cellules gliales - non neuronales -, **microglie**, **astrocytes** et **oligodendrocytes**, composent également la population cellulaire du cortex cérébelleux et se situent aussi bien dans la substance grise que dans la substance blanche (Sotelo, 1967). Notamment, les cellules épithéliales de Golgi ou glie de Bergmann sont des éléments de la glie astrocytaire du cervelet. Ces cellules, localisées au voisinage des somas des cellules de Purkinje, émettent de fins prolongements rectilignes perpendiculaires à, et en direction de la pie mère, appelées fibres de Bergmann. Au cours du développement, c'est le long de ces fibres que les grains post-mitotiques migrent de la couche externe vers la couche interne (Ramón y Cajal, 1911).

II.1.2. Les afférences du cortex cérébelleux

Le cortex du cervelet de souris reçoit trois types d'afférences: les fibres grimpanes, les fibres moussues et les fibres monoaminergiques.

Les fibres grimpanes, axones des neurones de l'olive inférieure (noyau localisé dans le bulbe) se divisent dans la couche moléculaire au niveau du dendrite primaire en plusieurs ramifications épaisses et lisses qui se divisent, à leur tour, en branches à varicosités. Ces terminaisons forment de nombreuses synapses avec l'arbre dendritique des cellules de Purkinje, et sont donc monoplanaires comme celle de l'arborisation des cellules de Purkinje. Ramón y Cajal, qui les a découvertes dès 1888, en fit la description suivante: "l'arborisation (...), au sein de la couche moléculaire (...), s'enroule et serpente en quelque sorte tout le long de la tige protoplasmique ascendante de la cellule de Purkinje ainsi qu'autour des branches

principales de celle-ci, à la façon des lianes ou du lierre qui grimpe le long du tronc et des grosses branches d'un arbre. C'est pourquoi nous appelons ces plexus terminaux arborisations ou plexus grimpants" (Ramón y Cajal, 1890). Fait remarquable, chez l'adulte, chaque cellule de Purkinje n'est innervée que par une seule fibre grimpante, par contre, une fibre grimpante innerve en moyenne six cellules de Purkinje.

Les fibres moussues dont l'origine est multiple (noyaux vestibulaires, moelle épinière, formation réticulée, noyaux du pont, etc.), produisent de nombreuses collatérales dans la substance blanche, et se terminent dans la couche granulaire interne (Ramón y Cajal, 1888, 1890). L'extrémité des fibres moussues forme une dilatation relativement large et torturée, leur donnant, selon Ramón y Cajal (1911), "l'aspect d'un lambeau de mousse". Les terminaisons moussues entrent en contact avec les dendrites des cellules des grains, eux-mêmes contactés par les axones des cellules de Golgi ; ces trois composantes forment un glomérule (voir figure 18). Les fibres moussues seraient majoritairement excitatrices (glutamatergiques).

Les fibres monoaminergiques (noradrénergiques et sérotoninergiques) ont un effet modulateur, régulant surtout la transmission synaptique entre les interneurons corticaux et les cellules de Purkinje. Elles pénètrent le cervelet par les pédoncules cérébelleux.

Les fibres noradrénergiques du cervelet sont issues du locus coeruleus. Elles se distribuent dans la substance blanche, la couche interne des grains, entourant les glomérules (Kimoto *et al.*, 1981) et s'orientent dans la couche moléculaire (Mugnaini et Dahl, 1975) où elles contactent quelques épines des dendrites principales des cellules de Purkinje.

Les fibres sérotoninergiques sont issues du raphé médian. Elles sont abondantes au niveau des noyaux profonds mais certaines d'entre elles sont localisées dans les couches granulaire et moléculaire et particulièrement sous la surface piale (Takeuchi *et al.*, 1982).

II.1.3. Réseau neuronal du cortex cérébelleux

Le cortex cérébelleux est une structure hautement répétitive constituée au niveau microscopique par la répétition un très grand nombre de fois du même circuit élémentaire (figure 20) qui a été analysé en détail sur le plan anatomique depuis les premiers travaux de Cajal (Ramón y Cajal, 1911) et sur le plan microphysiologique depuis la description de Eccles

et ses collaborateurs (Eccles *et al.*, 1967). Ce circuit est organisé autour de la cellule de Purkinje.

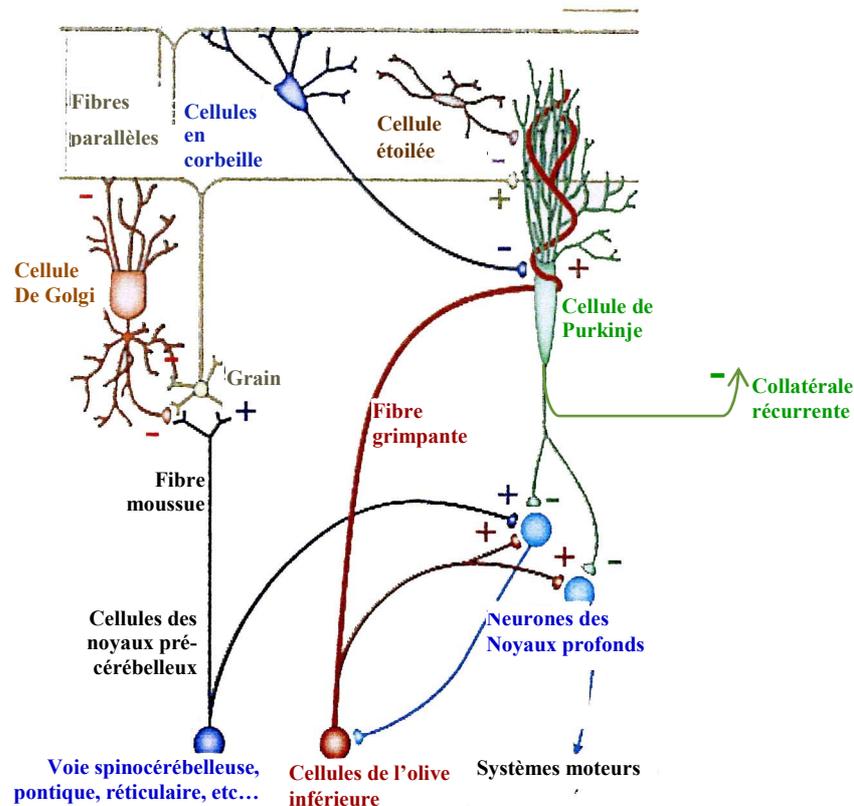


Figure 20: Représentation schématique du motif élémentaire de connexions synaptiques du cervelet. + signifie que ces fibres sont excitatrices, - qu'elles sont inhibitrices.

Le cortex cérébelleux est donc le lieu d'intégration des informations envoyées au cervelet et plus particulièrement, la cellule de Purkinje est son centre intégrateur et sa seule efférence. Chaque cellule de Purkinje, qui n'est contactée que par une seule fibre grimpante chez l'adulte, l'est également par 200 000 fibres parallèles. L'activité des cellules de Purkinje est modulée par les trois types d'interneurones inhibiteurs (cellules étoilées, cellules en corbeille et cellules de Golgi). Ces trois types d'interneurones sont tous stimulés par les grains. Contrairement aux deux autres types de cellules, les cellules de Golgi contrôlent la durée d'excitation des cellules de Purkinje par les grains puisqu'elles font synapse sur les dendrites au niveau des glomérules. Une action latérale d'une cellule de Purkinje sur une autre est également possible par l'intermédiaire des collatérales récurrentes de l'axone des cellules de Purkinje, cet effet se traduisant par une inhibition puisque ces cellules sont GABAergiques.

II.2. Développement du cervelet

Tous les neurones du cerveau adulte sont issus de la multiplication de précurseurs indifférenciés localisés à des stades très précoces dans le neuroépithélium du tube neural.

Le cervelet chez la souris se développe pendant 6 semaines entre l'âge embryonnaire 7 (E7) et l'âge postnatal 30 (P30; figure 22). Le développement du cervelet est dominé par des interactions de deux épithélia germinatifs, la zone ventriculaire du 4^{ème} ventricule qui produit les cellules de Purkinje (pour revue, voir Goldowitz et Hamre, 1998; Wang et Zoghbi, 2001) et la couche des grains externe (CGE ou EGL/ *External Granular Layer*), qui produit les cellules granulaires, ou grains du cervelet).

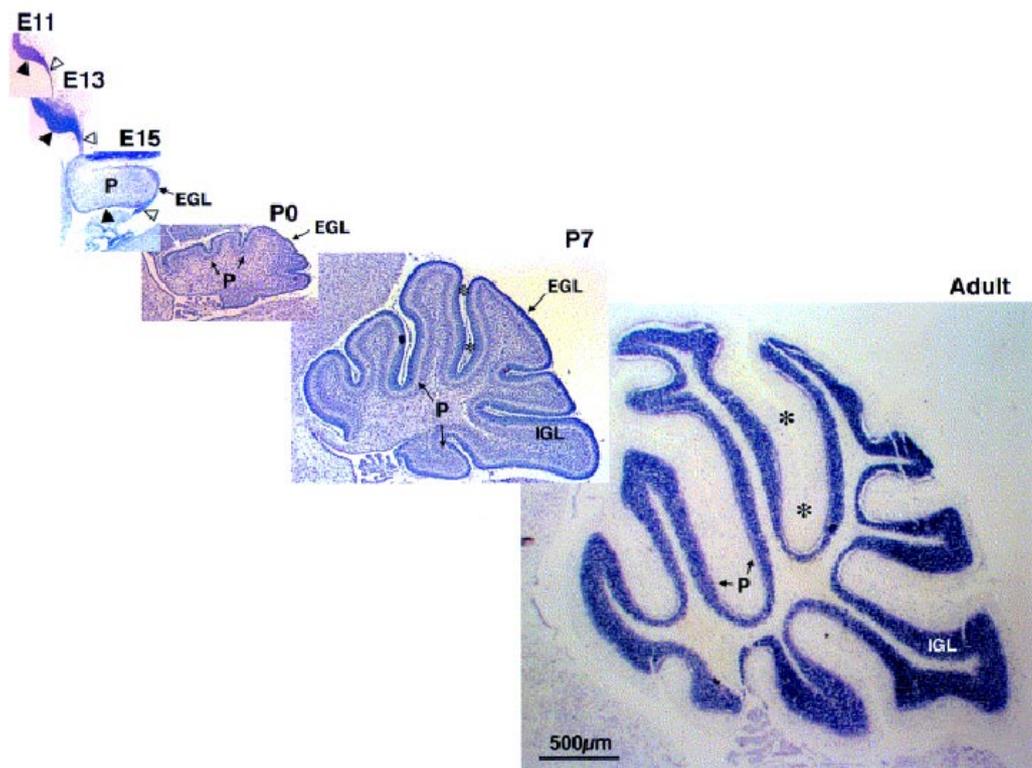


Figure 22: Coupes sagittales de cervelet de souris à différents stades de développement.

Aux stades embryonnaires, on distingue l'épithélium de la zone ventriculaire (tête de flèche noire) et la lèvre rhombique (tête de flèche blanche). À E15 apparaît la couche des grains externe (EGL) et à P0 on peut distinguer la couche des cellules de Purkinje (P). À P7, la couche des grains interne (IGL) est déjà bien développée. La fissure primaire est indiquée par des astérisques. D'après Goldowitz et Hamre, 1998.

II.2.1. Développement embryonnaire

Le tube neural est transitoirement subdivisé transversalement en un certain nombre de segments, les neuromères séparés les uns des autres par des constriction interneuromériques, perpendiculaires à l'axe longitudinal du tube (Orr, 1887; Keynes et Lumsden, 1990). Ces neuromères apparaissent progressivement, et leur nombre augmente par divisions successives d'unités plus étendues, les vésicules céphaliques.

On distingue classiquement trois puis quatre vésicules primordiales: le prosencéphale (la plus rostrale), le mésencéphale, le métencéphale puis le rhombencéphale (la plus caudale; voir figure 23). C'est en grande partie grâce à la méthode des chimères caille-poulet, mise au point par Nicole Le Douarin (Le Douarin, 1982), que l'étude du devenir des différents neuromères a été rendue possible. Cette technique a notamment permis de déterminer l'origine dans le tube neural des neurones cérébelleux et olivaires (pour revue, voir Hallonet et Alvarado-Mallart, 1997). D'autres techniques, de génie génétique et de marquage, ont permis par la suite de préciser la localisation des précurseurs neuronaux composant le système olivo-cérébelleux.

Les cellules du cervelet proviennent de la portion du tube neural situé en position rostrale de la vésicule métencéphalique (figure 23). Dans le cerveau embryonnaire, le cervelet dérive de la partie rostrale des lèvres rhombiques, alors que l'olive inférieure dérive de la partie la plus caudale des lèvres rhombiques (Tan et Le Douarin, 1991; Marin et Puelles, 1995; Hallonet et Le Douarin, 1993).

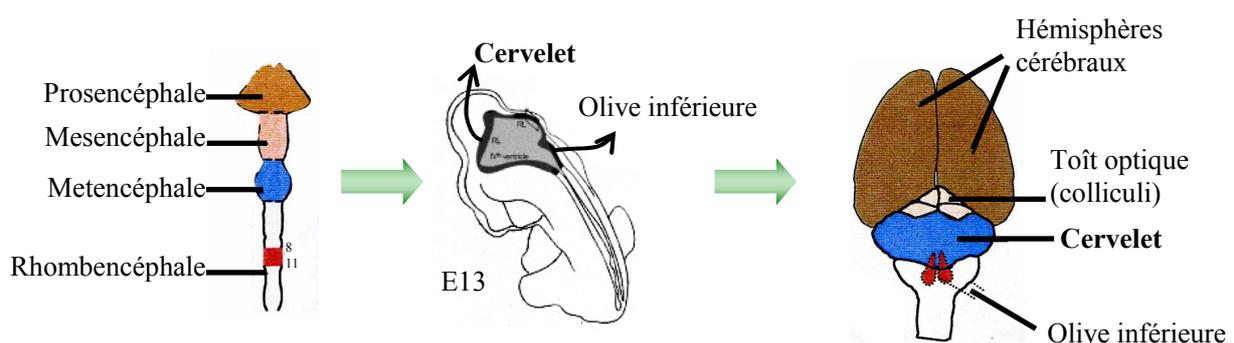


Figure 23: Représentation schématique des territoires présomptifs du cervelet et de l'olive inférieure. Observé en position dorsale, le cervelet dérive d'un territoire de la constriction métencéphalique et l'olive des rhombomères caudaux 8 à 11, adapté de Hallonet et Le Douarin, 1993. De la zone rostrale des lèvres rhombiques, un mouvement prolifératif externe donnera le cervelet, alors que les neurones de l'olive inférieure proviennent de la lèvre rhombique caudale, adapté de Hatten *et al.*, 1997.

L'origine mes- métencéphalique a été confirmée par des expériences de génétique chez la souris que je ne détaillerai pas ici. A titre d'exemple, le gène *engrailed 1* (*En1*) s'est révélé primordial quant à la spécification et au développement du territoire cérébelleux. En effet, l'expression de *En1* commence très tôt au cours du développement, dès E8, et est restreinte aux territoires présomptifs du cervelet dès E9. De plus, les souris KO pour *En1* sont dépourvues de cervelet (Hatten et Heintz, 1995).

Le développement morphologique général du cervelet se déroule comme indiqué sur la figure 24. L'ébauche du cervelet apparaît initialement sous l'aspect d'une paire de renflements symétriques situés de part et d'autre du plancher du quatrième ventricule, juste en arrière de la région isthmique (A). La croissance en direction dorso-médiane entraîne le rapprochement (B) puis la rencontre (C) des deux renflements latéraux et donc la formation de la lame cérébelleuse.

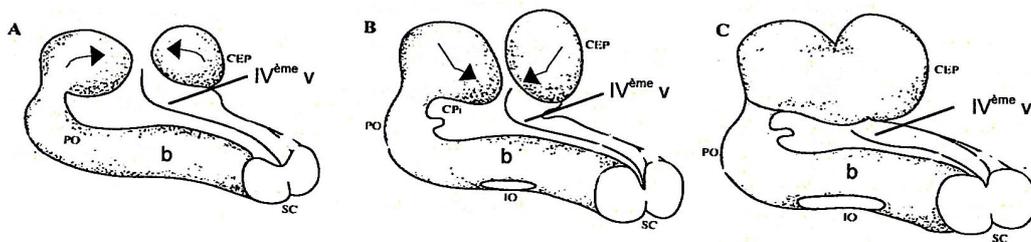


Figure 24: Représentation schématique du développement de la lame cérébelleuse. IVème v: IVème ventricule, b: bulbe, CEP: primordium cérébelleux, IO: olive inférieure, PO: pont, SC: moelle épinière. Adapté de Altman et Bayer, 1997.

Des expériences de marquage à la thymidine tritiée ont permis de localiser et surtout de dater la naissance des différentes populations neuronales qui composent le cervelet de souris (Uzman, 1960; Miale et Sidman, 1961; Fujita *et al.*, 1966).

II.2.2. Provenance des catégories cellulaires cérébelleuses

Au sein de l'ébauche cérébelleuse, les cellules du futur cervelet proviennent de deux zones prolifératives (schématisées dans la figure 25):

- l'épithélium ventriculaire germinatif du quatrième ventricule, qui génère les noyaux profonds, les cellules de Purkinje, puis les interneurons de la couche moléculaire ainsi que les cellules gliales du cortex.

- une couche germinative (ou granulaire) externe (CGE ou EGL) à partir de laquelle seront générés les grains.

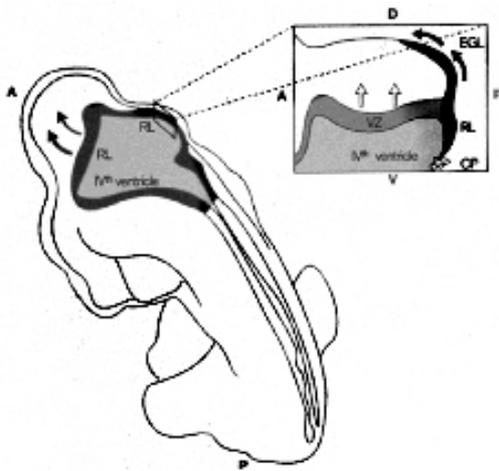


Figure 25: Représentation de l'épithélium générant les grains (EGL) et l'épithélium ventriculaire germinatif du IV^{ème} ventricule.

RL, lèvre rhombique, A, rostral, P, postérieur, V, ventral et D, dorsal.

Adapté de Hatten *et al.*, 1997.

Les cellules du neuroépithélium ventriculaire à la jonction entre le mésencéphale et le métencéphale commencent à proliférer entre E10 et E14. Les premières cellules post-mitotiques sont produites entre E10 et E12 chez la souris et correspondent aux neurones des noyaux profonds. Les cellules de Purkinje sont produites entre E11 et E13 et migrent pour constituer la zone du manteau (ou zone intermédiaire; voir figure 26). Les cellules de Golgi sont elles aussi issues du neuroépithélium ventriculaire et sont générées peu après les cellules de Purkinje.

Au moment où les précurseurs des neurones des noyaux profonds et des cellules de Purkinje arrêtent leur prolifération, les précurseurs de la couche des grains externe commencent à proliférer à partir de l'extrémité caudale du neuroépithélium métencéphalique (la lèvre rhombocéphalique).

Ce groupe de cellules en division "ruisselle" rostralement au-dessus de la lèvre et sous la surface du primordium (voir figure 26), où il s'établit en zone germinative: la couche germinative externe (CGE, ou EGL). La prolifération des cellules de la CGE continue, cette population croît et se déverse rostro-médialement le long du toit du primordium.

A partir de la naissance, la couche monocellulaire des précurseurs des grains continue de proliférer activement, pour engendrer une couche de 8 cellules d'épaisseur et poursuit sa prolifération jusqu'au jour postnatal 18 (P18) où la CGE disparaît. Les grains sont issus des cellules de la CGE qui sortent du cycle de division. Ces cellules migrent radialement, traversent la couche moléculaire et la couche des cellules de Purkinje pour former la couche de grains interne (CGI).

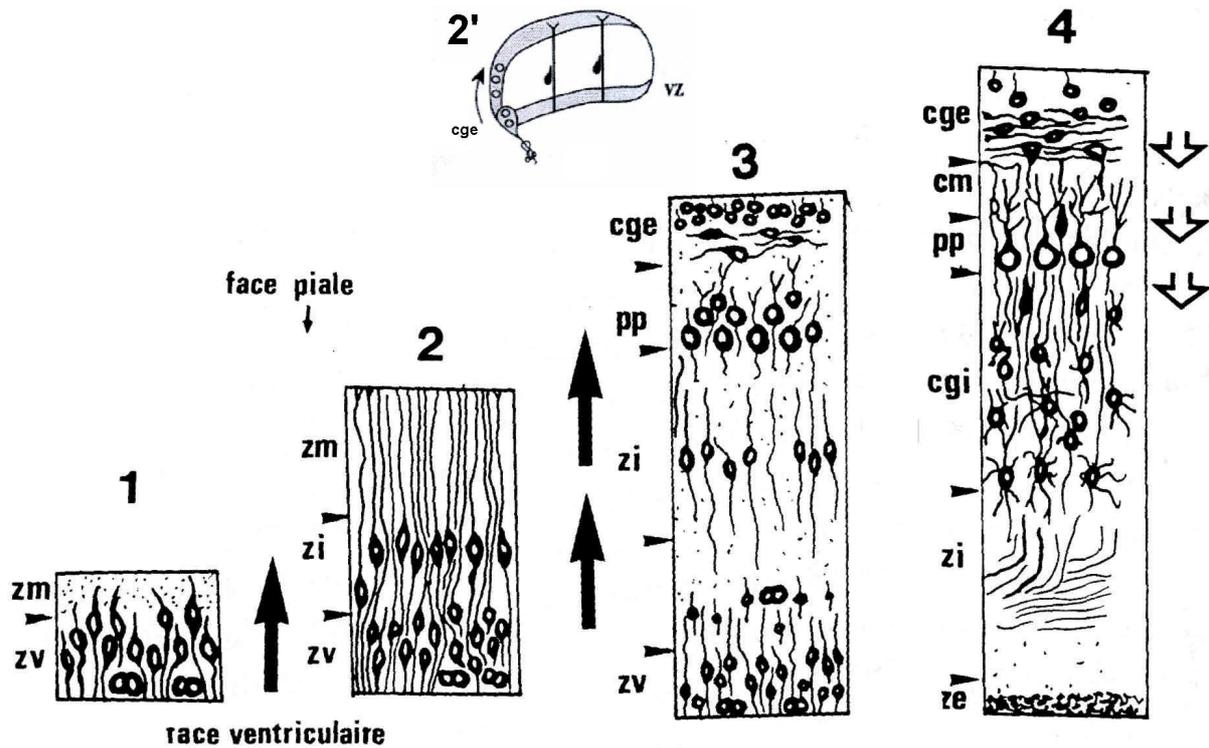


Figure 26: Migrations neuronales dans le cortex cérébelleux en développement. Le schéma montre la migration des précurseurs des cellules de Purkinje à partir de la zone ventriculaire (zv) vers la zone intermédiaire (zi) pour constituer la couche des cellules de Purkinje (pp, *Purkinje plate*). Parallèlement, les précurseurs des grains migrent à la surface de la lèvre rhombencéphalique pour constituer la CGE (2'). Durant la première semaine post-natale, commence la différenciation des grains et leur migration le long de la glie de Bergmann à travers la couche des cellules de Purkinje (pp). En même temps, l'axone des grains s'allonge et se divise en deux dans la couche moléculaire (cm) pour former les fibres parallèles. D'après Hatten et Heintz, 1995; Hatten, 1999.

II.3. Survie des cellules de Purkinje

Le contrôle de la survie neuronale au cours du développement et du vieillissement du système nerveux est l'un des paramètres essentiels de la mise en place et du maintien du fonctionnement cérébral. Alors que la quasi-totalité des neurones sont produits au cours de la période embryonnaire ou durant les premières semaines de la vie, la disparition d'un grand nombre de neurones (une grande partie: 20 à 80% selon les régions) au cours du développement normal est aussi nécessaire à la mise en place d'un cerveau "fonctionnel" (Haydar *et al.*, 1999). Les neurones produits en surnombre sont éliminés par des phénomènes de mort cellulaire au cours du développement (Oppenheim, 1991; Henderson, 1996). Cette mort neuronale, qualifiée de développementale, est génétiquement programmée et fait intervenir différentes voies de signalisation intra- et extra-cellulaires. A cette perte des neurones au cours du développement s'ajoute une perte neuronale intervenant au cours du vieillissement normal. Par ailleurs, des pertes neuronales "pathologiques" peuvent également survenir à la suite de diverses maladies (ischémie, maladies neurodégénératives...) et altérer le fonctionnement cérébral.

II.3.1. Survie neuronale, apoptose et stress oxydatif

La mort des neurones, qu'elle soit physiologique ou pathologique, pendant le développement ou au cours du vieillissement, peut se produire par divers mécanismes que l'on distingue en particulier par des caractéristiques morphologiques (voir §II.3.1.1).

Le stress oxydatif, induit par une forte production de radicaux libres, semble être incriminé dans diverses situations de mort neuronale. Il est bien connu que le cerveau est exposé à de fortes quantités d'oxygène (1/5 de l'oxygène total est consommé par le tissu nerveux), oxygène qui est la source d'une production de radicaux libres oxygénés lors des réactions d'oxydoréduction intervenant dans la chaîne respiratoire mitochondriale. De plus, le tissu nerveux est très riche en fer, ce qui permet la formation de radical hydroxyle très toxique pour les constituants cellulaires alors qu'il exprime peu de catalase, un enzyme permettant la réduction des radicaux libres oxygénés. Ces caractéristiques rendent le cerveau particulièrement sensible au stress oxydatif.

Dans cette partie, je décrirai les types de mort neuronale et l'influence du stress oxydatif sur la mort neuronale.

II.3.1.1. Types de mort neuronale

Lors d'une étude classique de mort cellulaire au cours du développement, Schweichel et Merker (1973) divisaient déjà la mort cellulaire en trois types distincts selon les caractéristiques ultrastructurales. Lors d'une étude reprise par Clarke (1990), trois grands types de mort cellulaire ont été distingués: l'apoptose (type 1), l'autophagie (type 2) et la mort non lysosomale (type 3) qui regroupe la désintégration non lysosomale (type 3A) et la mort cytoplasmique ou nécrose (type 3B). Nous décrivons ici plus particulièrement la mort de type apoptotique car elle est la mieux caractérisée, et nous intéressera particulièrement dans cette thèse.

- L'apoptose (type 1)

En 1972, Kerr emploie pour la première fois le terme "apoptose" (d'après le mot grec qui signifie "chute des feuilles d'un arbre") en référence à la chute des feuilles en automne, pour décrire un programme intrinsèque à la cellule, impliqué dans le renouvellement cellulaire (Kerr *et al.*, 1972), et différent de la mort nécrotique, seul type de mort connu à cette époque. L'apoptose est un processus de mort cellulaire programmée, en réponse à des signaux intra ou extra-cellulaires déclencheurs de mort, ou à l'absence de signaux de survie dans l'environnement de la cellule. C'est une forme active d'autodestruction qui correspond à une réaction de l'organisme à des stimuli physiologiques ou pathologiques. Elle résulte de l'exécution d'un programme hautement régulé qui consiste en l'activation d'enzymes et l'expression de nombreux gènes pro- ou anti-apoptotiques qui vont induire la destruction d'une cellule tout en préservant l'intégrité tissulaire environnante.

L'apoptose est caractérisée par une condensation de la chromatine et du cytoplasme, puis la rupture de la membrane et une fragmentation du noyau et de l'ADN, le bourgeonnement des membranes et la formation de corps apoptotiques, petites vésicules qui sont enfin phagocytées et dégradées par les cellules voisines (figure 27; Wyllie *et al.*, 1980; Wyllie *et al.*, 1984).

L'intégrité des organites de la cellule est généralement maintenue jusqu'à la phagocytose des corps apoptotiques. Le cytosol et les protéines intracellulaires ne sont pas libérés dans l'espace intercellulaire, ce qui permet de diminuer le déclenchement d'un processus inflammatoire. Ce phénomène est impliqué aussi bien au cours du développement (Meier *et al.*, 2000) qu'au cours de différentes pathologies.

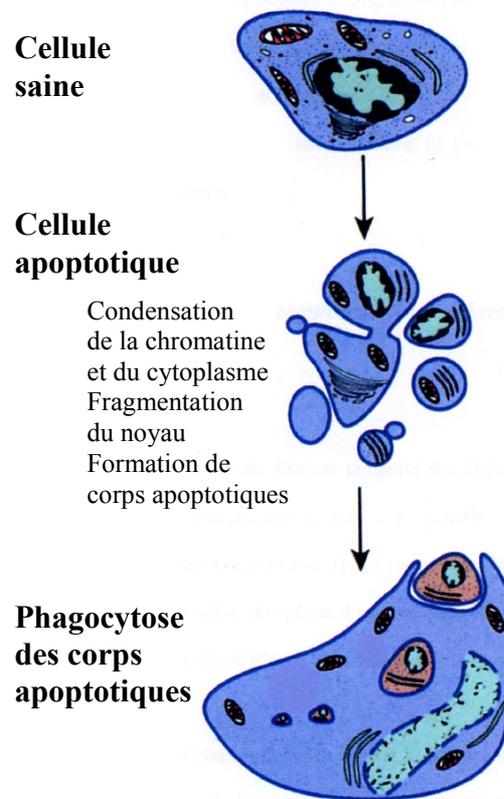


Figure 27: Morphologie d'une cellule apoptotique. D'après Schwartz et Osborne, 1995.

- Principales protéases de l'apoptose: les caspases

Un grand nombre de données suggère que la mort ayant lieu au cours du développement est, au moins en partie, exécutée par un mécanisme d'apoptose. C'est un processus actif et génétiquement programmé (Wyllie *et al.*, 1980). Les études de ces dix dernières années ont identifié des acteurs moléculaires clefs de cette voie, que sont les caspases, une famille très conservée de protéases à cystéine (*Cysteine aspartate proteases*). Les caspases, synthétisées sous la forme de précurseur, deviennent actives après clivage. Les caspases actives exécutent le processus apoptotique: en effet, elles ont pour fonction la mise en route du programme apoptotique en s'activant en cascade, les caspases initiatrices activant par clivage les caspases effectrices. Les caspases effectrices sont déterminantes pour l'exécution du programme apoptotique et directement impliquées dans la destruction de la cellule. Elles désorganisent la cellule en protéolysant certains constituants du cytosquelette et du noyau comme la gelsoline ou les lamines A et B1. Elles désactivent également des protéines anti-apoptotiques, comme par exemple ICAD, l'inhibiteur d'une des principales DNAses (CAD) responsable de la fragmentation oligonucléosomique (Liu *et al.*, 1997; Enari

et al., 1998 et voir figure 28) ou certains membres de la famille Bcl-2. Trois catégories de caspases peuvent être distinguées selon leur niveau dans la cascade: les caspases initiatrices de l'apoptose (caspase 8, 9, 10 et 12), les caspases générant des cytokines pro-inflammatoires (caspase 1, 4, 5, 11 et 13), et les caspases effectrices de l'apoptose (caspase 3, 6 et 7; Zhivotovsky, 2003). La caspase 2 semble être une protéine à part puisqu'elle présente à la fois les caractéristiques d'une caspase initiatrice et exécutive (Lassus *et al.*, 2002; Troy et Shelanski, 2003; He *et al.*, 2004; Tinel et Tschopp, 2004).

- Voies d'activation des caspases et rôle des membres de la famille Bcl-2

Différents stimuli peuvent être à l'origine d'une cascade apoptotique et on peut considérer que leur action se déroule en deux voies distinctes: la voie extrinsèque et la voie intrinsèque (voir figure 28).

Dans la voie extrinsèque, la liaison d'un facteur de mort sur son récepteur initie directement la voie des caspases, par exemple la liaison du ligand FasL (CD95L) sur son récepteur (CD95). Cette voie met en jeu l'activation d'une certaine catégorie de caspases, les caspases initiatrices, dont la caspase 8. La voie dite intrinsèque est empruntée à la suite de tous les autres stimuli (modifications génomiques, modification de paramètres internes à la cellule, activation de certains récepteurs présents à la surface de la cellule, ...). La voie intrinsèque requiert que la mitochondrie libère différents facteurs apoptogènes tels Smac/Diablo, AIF ou le cytochrome c (Zamzami et Kroemer, 2001), impliqués dans l'initiation de la cascade d'activation des caspases. Cette libération est sous le contrôle des protéines pro- ou anti-apoptotiques de la famille Bcl-2: elle peut être inhibée par Bcl-X_L ou Bcl-2, alors qu'elle est induite par Bax. Cette régulation pourrait se faire grâce à une propriété de certaines protéines de la famille Bcl-2, à savoir leur capacité à former des canaux dans la membrane mitochondriale. En influant sur l'homéostasie de la mitochondrie, elles provoquent l'ouverture d'un pore non-spécifique appelé pore de transition de perméabilité (PTP), ce qui a pour conséquence une entrée d'eau et de solutés dans la matrice mitochondriale, et donc son gonflement. Ceci entraîne la rupture de la membrane externe de cette organelle, et permet la libération du cytochrome c dans le cytosol, initiant l'activation des caspases (Vander Heiden et Thompson, 1999; Desagher et Martinou, 2000).

Dans de nombreux types cellulaires, les cascades de ces deux voies, intrinsèque et extrinsèque, sont connectées. L'exemple paradigmatique de ces inter-relations est le clivage

de Bid par la caspase 8 (voie Fas) qui déclenche la voie mitochondriale via Bax (Barnhart *et al.*, 2003).

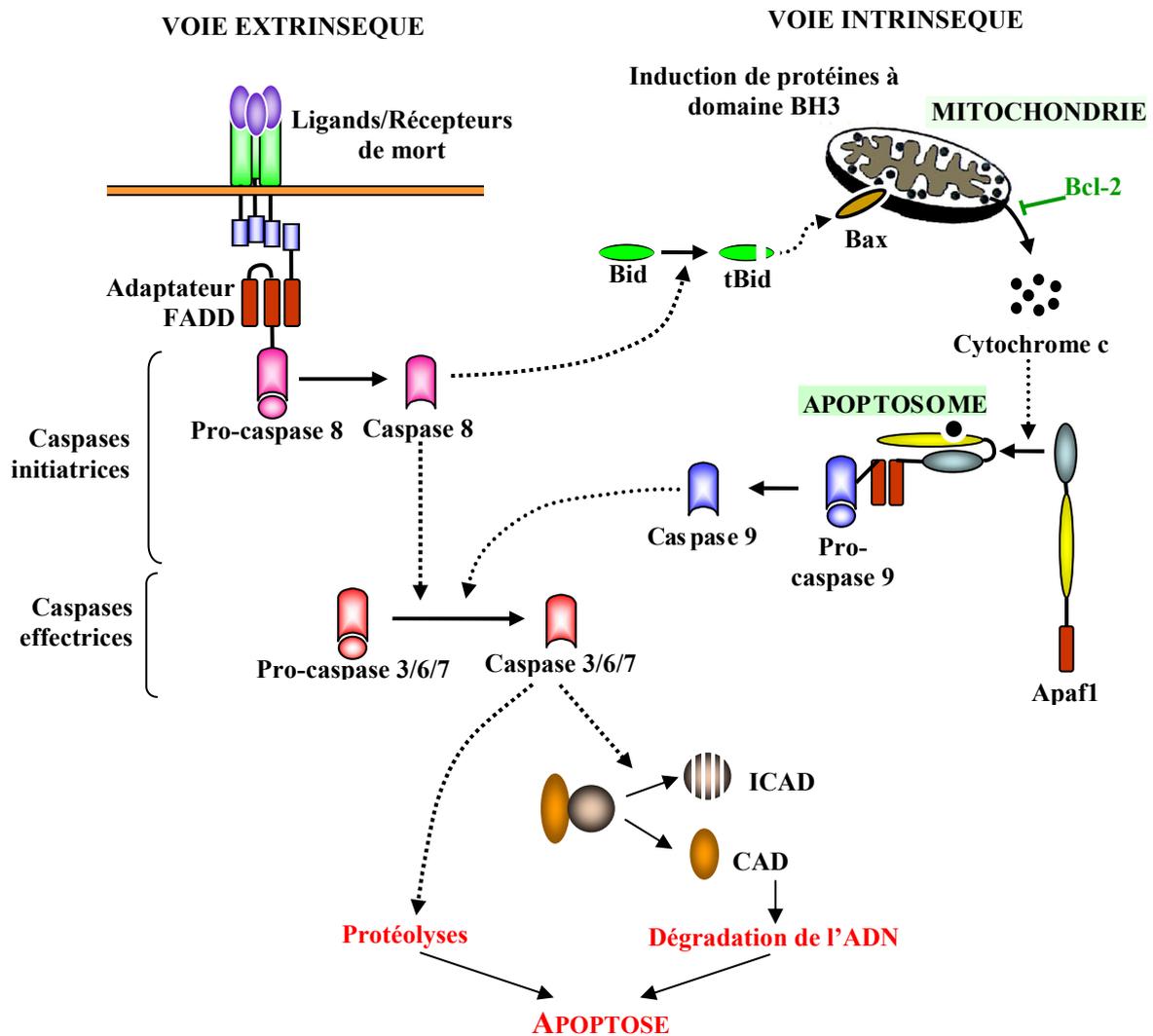


Figure 28: Les deux grandes voies apoptotiques. La voie extrinsèque (à gauche) et la voie intrinsèque (à droite). D'après Daniel *et al.*, 2003; Nagata, 2005.

- La mort cellulaire autophagique (type 2)

La mort cellulaire autophagique est caractérisée par la présence dans le cytoplasme de nombreuses vacuoles autophagiques d'origine lysosomale, suivie par une dilatation mitochondriale et un élargissement du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi. D'autres signes, comme une fragmentation nucléaire ou un bourgeonnement de la membrane, peuvent apparaître plus tardivement dans la mort autophagique, mais ne sont pas très fréquents.

La mort cellulaire par autophagie a été décrite dans les neurones au cours du développement (Schweichel et Merker, 1973), ou en association avec des dégénérescences neuronales pathologiques (Anglade *et al.*, 1997; Yue *et al.*, 2002; Selimi *et al.*, 2003). Alors que l'autophagie joue un rôle important dans l'homéostasie (renouvellement intracellulaire des organelles et des protéines à longue $\frac{1}{2}$ vie), son excès cause des destructions cellulaires. Une augmentation de l'activité lysosomale (accompagnée ou non d'un excès d'autophagie) a d'ailleurs été observée lors de la mort neuronale associée à des maladies neurodégénératives (Nixon et Cataldo, 1995).

La mort cellulaire par autophagie reçoit une attention particulière ces toutes dernières années, le détail des mécanismes moléculaires sous-jacents à ce processus doivent encore déterminés (pour revue, voir Levine et Klionsky, 2004).

- La mort non lysosomale (type 3)

La mort non lysosomale (type 3) se distingue du second type par la non-implication des lysosomes dans cette mort. Au contraire, cette mort commence par un gonflement des organelles intracellulaires suivi par la formation d'espaces vides dans le cytoplasme qui peuvent éventuellement fusionner entre eux. Ce type 3 de mort cellulaire a été divisé en deux sous-types par Clarke (1990): **La mort cytoplasmique (type 3B)** partage de nombreuses caractéristiques avec la nécrose définie par Kerr et Wyllie (Kerr *et al.*, 1972; Wyllie *et al.*, 1984). Elle est caractérisée par une dilatation du réticulum endoplasmique rugueux, un gonflement des mitochondries, puis par une désintégration des organelles en vésicules. **La désintégration non lysosomale (type 3A)** ressemble à une mort cytoplasmique mais en diffère par une désintégration plus spectaculaire de la cellule affectant également la membrane plasmique et le noyau.

II.3.1.2. Radicaux libres et stress oxydatif

L'homéostasie "redox" de la cellule, ou l'équilibre entre la production des radicaux libres et leur dégradation, est importante pour la survie et les fonctions cellulaires. Ainsi, l'état redox peut réguler diverses voies de signalisation dans diverses fonctions physiologiques. Cependant, l'exposition de la cellule à de fortes concentrations de radicaux libres peut entraîner la mort de la cellule.

Le mécanisme majeur de l'homéostasie redox est basée sur un rétrocontrôle: les ROS sont capables d'activer des voies de transductions qui conduisent à l'augmentation de l'expression de protéines anti-oxydantes. Ainsi, l'exposition d'une cellule à des radicaux libres module des voies de transduction variées, en particulier en modifiant l'état redox thiol/disulfure des protéines, et augmente l'activité de nombreux facteurs de transcription (Schulze-Osthoff *et al.*, 1995; Lander *et al.*, 1996; Monteiro et Stern, 1996; Sen et Packer, 1996; Flohe *et al.*, 1997; Piette *et al.*, 1997; Adler *et al.*, 1999a, b).

- Provenance cellulaire des radicaux libres

La production cellulaire de radicaux libres est une conséquence inévitable de la respiration aérobie qui consomme de l'oxygène moléculaire (dioxygène; O₂). Le métabolisme énergétique des organismes aérobiques dépend de la phosphorylation oxydative, processus par lequel l'énergie du transfert d'électrons à partir du NADH formé lors du cycle de Krebs (chaîne de réactions chimiques qui prend la suite de la glycolyse anaérobie) est transformé en une liaison phosphate riche dans la molécule d'ATP. C'est l'oxygène moléculaire qui sert d'accepteur final des électrons lors de ce transfert (d'où le nom de chaîne respiratoire): 1 molécule d'O₂ est réduite par 4 électrons en 2 molécules d'H₂O par la cytochrome-c oxydase (voir figure 29). A l'état fondamental, l'O₂ est un bi-radical avec deux électrons célibataires à spins parallèles placés dans des orbitales antiliantes ($\bullet\text{O}\equiv\text{O}\bullet$), ce qui ne lui permet pas d'accepter simultanément les 4 électrons nécessaires à sa réduction en H₂O. Ainsi, la réduction incomplète de l'O₂ en H₂O peut conduire à la formation d'intermédiaires réduits, des métabolites de l'oxygène hautement réactifs, dont l'anion superoxyde O₂^{-•} (O₂ réduit par une seul électron) et le peroxyde d'hydrogène H₂O₂ (O₂ réduit par deux électrons) (Boveris *et al.*, 1976; Turrens *et al.*, 1985; Sugioka *et al.*, 1988; Massa et Giulivi, 1993).

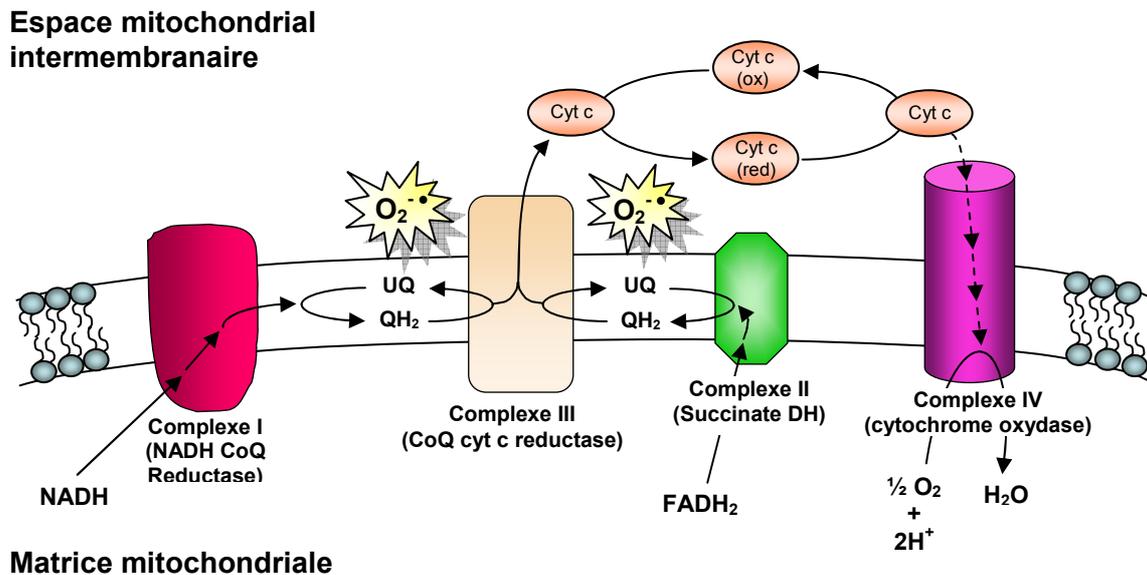


Figure 29: La chaîne respiratoire mitochondriale et la production d'O₂^{•-}.

La production de ces espèces réactives de l'oxygène, ou radicaux libres oxygénés (RLO ou ROS/*Reactive Oxygen Species*), est non négligeable puisque 1 à 2% des électrons de la chaîne de transfert conduit à la formation de RLO en conditions physiologiques (Boveris et Chance, 1973; Nohl et Hegner, 1978).

Les ROS peuvent également provenir d'autres réactions métaboliques cellulaires (bêta-oxydation peroxysomale des acides gras), ou de cellules phagocytaires (pour revue, voir Beckman et Ames, 1998), et peuvent être produits lors de réactions enzymatiques cellulaires tissu-spécifique, par exemple lors de la déamination de la dopamine par la monoamine oxydase dans les neurones dopaminergiques.

Les ROS peuvent également être produits à la suite de l'exposition des cellules à différentes molécules, telles que le second messenger céramide (Pena *et al.*, 1997; Quillet-Mary *et al.*, 1997), le peptide A β impliqué dans la maladie d'Alzheimer (Behl *et al.*, 1994), les rayons ultra-violettes (Scharffetter-Kochanek *et al.*, 1997). La neurotoxicité de certains composés semble être médiée par le stress oxydatif (Behl *et al.*, 1994; France-Lanord *et al.*, 1997; Mark *et al.*, 1997; Pike *et al.*, 1997; Keller *et al.*, 1998; Ekinci *et al.*, 1999).

Les enzymes superoxyde dismutases (SODs) convertissent l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène (Fridovich, 1978; Deby et Goutier, 1990). En présence des formes

réduites de métaux de transition (Fe^{3+} , Cu^{2+}), le peroxyde d'hydrogène peut être converti en radical hydroxyl OH^\bullet (Chance *et al.*, 1979), espèce hautement réactive, qui peut induire une toxicité cellulaire en oxydant des protéines, les lipides et l'ADN (conduisant à la cassure des molécules d'ADN) et à l'induction de la mort cellulaire (Freeman et Crapo, 1982; Grune *et al.*, 1997; Thannickal et Fanburg, 2000; voir figure 30).

Les radicaux libres peuvent également être issus de l'azote (espèces réactives de l'azote). Dans ce cas, le radical NO^\bullet est produit par l'oxydation d'une des terminaisons guanidine de la L-arginine (Palmer *et al.*, 1988). Cette réaction est catalysée par l'enzyme NOS. En fonction du micro-environnement, le NO peut être converti en différentes espèces réactives, comme le cation nitrosonium (NO^+), l'anion nitroxyl (NO^\ominus) ou le peroxydinitrite (ONOO^\ominus). Le peroxydinitrite peut mener à la formation d' H_2O_2 (Stamler *et al.*, 1992).

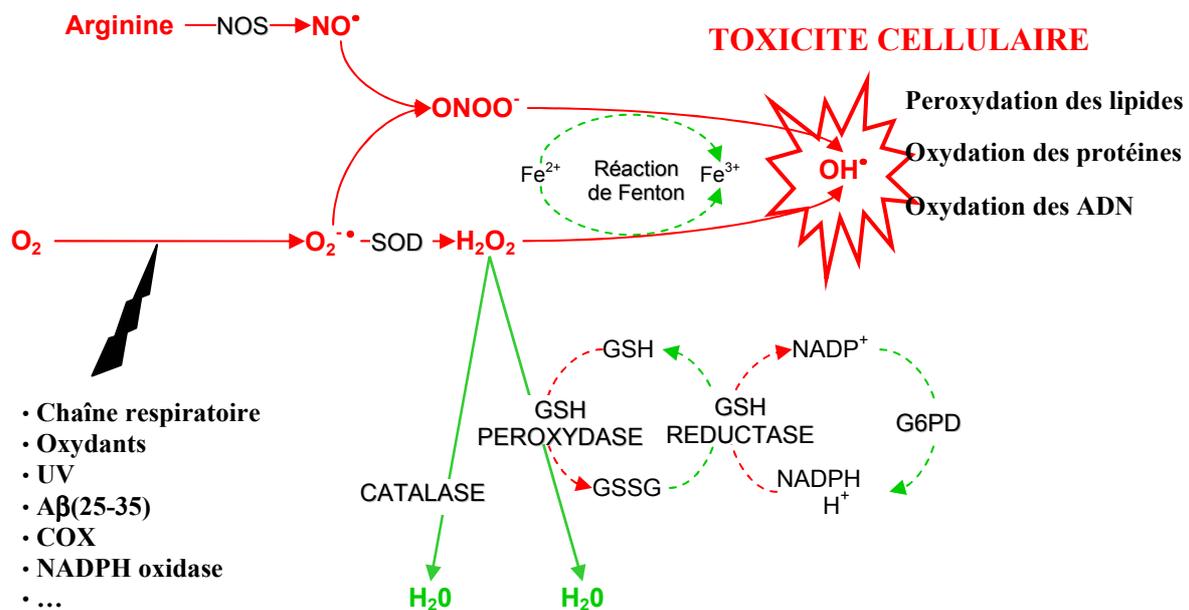


Figure 30: Schéma représentant la production et la clairance enzymatique des radicaux libres. NOS, NO synthase; SOD, superoxydismutase; GSH, glutathion; G6PD, Glucose-6-phosphate déshydrogénase; COX: cytochrome-c oxydase; UV, ultra-violet. Les traits rouges indiquent une réaction d'oxydation du substrat et les traits verts indiquent des réactions de réduction du substrat.

- Clairance des radicaux libres

Les cellules sont dotées de plusieurs mécanismes de détoxification des radicaux libres. Ces mécanismes font intervenir des enzymes ainsi que des molécules anti-oxydantes (pour revue, voir Yu, 1994).

Les antioxydants sont définis comme des substances capables - à relativement faibles concentrations - de réduire des espèces oxydées et ainsi, diminuer ou retarder significativement l'oxydation de substrats cellulaires.

Les anti-oxydants cellulaires incluent:

- 1- les enzymes superoxydismutases (SODs) qui transforment l' $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 , et les enzymes qui convertissent l' H_2O_2 en H_2O , telles que catalase et peroxydases. Les peroxydases utilisent un cofacteur réduit tel que le glutathion (GSH) dans le cas des glutathion-peroxydases (GPx) ou la thioredoxine dans le cas des thioredoxine-peroxydases (aussi appelées peroxiredoxines, Prx).
- 2- des molécules hydrophiles telles que l'ascorbate, l'urate et le glutathion (GSH)
- 3- des molécules lipophiles telles que les tocophérols, les flavonoïdes, les caroténoïdes, l'ubiquinol...
- 4- les enzymes impliqués dans la réduction des formes oxydées de molécules antioxydantes (GSH reductase, dehydroascorbate reductase) ou impliqués dans le maintien de thiols dans les protéines (thioredoxine réductase).

Un déséquilibre entre les acteurs des voies de détoxification peut modifier la balance interne, exacerber le stress oxydatif et compromettre la physiologie cellulaire. Ainsi, la surexpression de la Cu-Zn SOD chez la souris semble mimer le syndrome de Down (dont cette souris est un modèle puisque le gène codant pour la SOD est localisé sur le chromosome 21). Par contre, le knock-out de ce gène chez la souris entraîne seulement des anomalies dans une sous-classe de neurones moteurs, celle atteinte dans la sclérose latérale amyotrophique (Reaume *et al.*, 1996). De façon surprenante, la délétion du gène codant pour la GPx n'entraîne pas de phénotype apparent chez la souris (souris fertile sans signes évidents d'une susceptibilité accrue au stress oxydatif; Ho *et al.*, 1997).

L'utilisation de ces défenses anti-oxydantes dépend des organismes mais aussi des tissus: par exemple la GPx joue un rôle très important chez les mammifères mais est absente chez les insectes (Vanfleteren, 1993; Sohal *et al.*, 1995b) et il existe trois différentes formes de SOD chez l'Homme (cytosolique Cu/Zn SOD, mitochondriale SOD et extracellulaire SOD), codées par trois gènes différents et régulés différemment (Fridovich, 1995).

- Réparation des dommages

Contrairement aux mécanismes de défenses cellulaires impliquant des anti-oxydants, la machinerie cellulaire utilisée pour la réparation des dommages est très peu explorée. Néanmoins, il est clair que les cellules réparent les lipides oxydés, via la phospholipase A2 qui clive les peroxydes des phospholipides (Pacifci et Davies, 1991), mais aussi les acides nucléiques oxydés (glycosylases qui reconnaissent et excisent spécifiquement les bases oxydés des double-brins d'ADN; voir Tchou *et al.*, 1991; Bohr et Anson, 1995; Croteau et Bohr, 1997; Cunningham, 1997), et les protéines oxydées (Rivett, 1990; Giulivi *et al.*, 1994; Stadtman, 1995).

II.3.1.3. Implication des radicaux libres dans les processus physiologiques

Les ROS sont impliqués dans la régulation de diverses fonctions physiologiques, telles que la régulation du tonus vasculaire, la perception de la tension de l'oxygène et la régulation des fonctions contrôlées par la concentration en oxygène (ventilation, production d'érythropoïétine, ...), de la transduction de signal à partir de récepteurs membranaires de cellules du système immunitaire, ainsi que dans l'homéostasie redox (pour revue, voir Droge, 2002).

L'accumulation des dommages cellulaires infligés par les radicaux libres pourrait résulter en une augmentation de la production des ROS au cours du vieillissement. En effet, il a été montré que la production de radicaux libres *in vitro* est plus importante dans les mitochondries prélevées sur des rongeurs vieux (gerbilles de 25 mois) comparées aux jeunes (5 mois; Sohal *et al.*, 1995a; Gabbita *et al.*, 1997).

Le stress oxydatif semble jouer un rôle central dans l'induction et le déroulement de l'apoptose (Slater *et al.*, 1995; Dumont *et al.*, 1999). En effet, nombre d'antioxydants sont capables d'inhiber l'apoptose induite par divers agents (pour revue, voir Buttke et Sandstrom, 1994).

II.3.1.4. Implication des radicaux libres dans la mort neuronale pathologique

Les molécules oxydantes sont capables de contribuer à la progression de diverses maladies neurodégénératives, telles que la maladie d'Alzheimer (Good *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 1997), la maladie de Parkinson (Barnett et King, 1995; Cohen *et al.*, 1997; Hunot *et al.*, 1997) et la sclérose latérale amyotrophique (Brown, 1995; Yim *et al.*, 1996). Le rôle des oxydants dans la maladie d'Alzheimer a été très étudié ces dernières années. La formation des plaques amyloïdes est associée à un repliement aberrant de la protéine APP (β -amyloid precursor protein) menant à la formation des dépôts amyloïdes de peptides A β (Selkoe, 1994). Il a été montré que la formation *in vitro* des peptides A β par clivage de la protéine APP est accélérée en présence d'oxygène mais aussi que le peptide A β , cytotoxique pour les neurones en culture, stimule la génération de molécules oxydantes (Smith *et al.*, 1995). En fait, il semble que les peptides amyloïdes génèrent eux-mêmes des oxydants *in vitro* (Hensley *et al.*, 1996).

L'implication des radicaux libres dans la mort pathologique des cellules de Purkinje a été mise en évidence dans la maladie de Menkes et l'Ataxie Telangiectasie (pour revue, voir Bickford *et al.*, 2000, et voir §II.3.3). De plus, les ROS semblent participer à la mort des cellules de Purkinje au cours du vieillissement normal (voir §II.3.2.2).

II.3.2. Mort des cellules de Purkinje pendant le développement et le vieillissement normal.

II.3.2.1. Une apoptose développementale des cellules de Purkinje?

Du fait qu'aucun bon marqueur de la totalité ou de la quasi-totalité des cellules de Purkinje chez la souris jeune (avant P3) n'ait été identifié, aucun marquage de cette population (du jeune neurone post-mitotique au neurone adulte) n'a pu être réalisé au cours du développement (Wassef *et al.*, 1985). Par conséquent, aucune quantification n'a pu être effectuée avant P4, date à laquelle les cellules de Purkinje forment une couche et sont aisément identifiables. La convergence d'un faisceau de résultats, certes indirects, suggère que les cellules de Purkinje subissent une apoptose au cours du développement, mais son existence reste cependant encore débattue.

Certaines études ont montré que les cellules de Purkinje normales ne semblent pas montrer de caractéristiques morphologiques d'une mort cellulaire programmée (Norman *et al.*, 1995). Cependant, un processus apoptotique impliquant les protéines Bcl-2 et Bax semble intervenir pendant le développement, comme le suggèrent les analyses des souris génétiquement modifiées pour ces gènes. Les souris inactivées pour le gène codant la protéine pro-apoptotique Bax ont environ 30% de cellules de Purkinje surnuméraires (Fan *et al.*, 2001).

De plus, les souris transgéniques surexprimant la protéine anti-apoptotique Bcl-2 dans les neurones post-mitotiques (car sous le contrôle du promoteur de l'énolase) présentent un nombre anormalement élevé de cellules de Purkinje (figure 31). Dans la lignée NSE73a, Bcl-2 s'exprime à partir de E13, soit à la fin de la prolifération des précurseurs des cellules de Purkinje. Cette lignée possède environ 40% de cellules de Purkinje de plus que les souris sauvages (Martinou *et al.*, 1994; Zanjani *et al.*, 1996, 1997). Dans la lignée NSE71, la surexpression de Bcl-2 est plus tardive (à partir de P0) et est associée à une augmentation du nombre des cellules de Purkinje de 23% seulement (Martinou *et al.*, 1994; Zanjani *et al.*, 1996). Ces résultats sur les lignées transgéniques de *bcl-2* suggèrent donc l'existence d'une (ou deux) période(s) d'apoptose des cellules de Purkinje à partir de E13.

Par ailleurs, des cellules de Purkinje pycnotiques ont été observées dans le primordium du cervelet chez des embryons de souris à E15 (Ashwell, 1990) et de poulet à E16 (Bertossi *et al.*, 1986). Certaines cellules de Purkinje présentent une activation de la caspase 3 caractéristique de l'apoptose entre P2 et P8 (Kitao *et al.*, 2004; Marin-Teva *et al.*, 2004).

Enfin, les cellules de Purkinje maintenues en culture organotypique subissent une apoptose massive lors d'une mise en culture entre P1 et P5, à un stade où les cellules de Purkinje sont dans un stade de synaptogenèse et de remodelage des dendrites (Dusart *et al.*, 1997; Ghoumari *et al.*, 2000; Ghoumari *et al.*, 2002). En revanche la mise en culture de

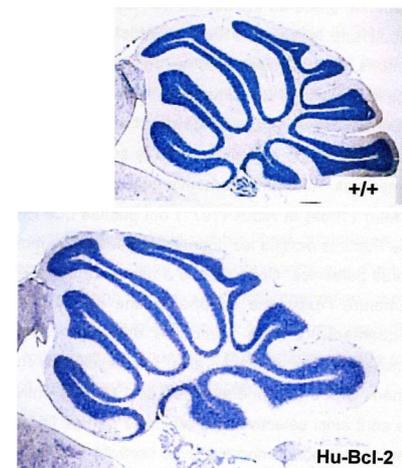


Figure 31: Le cervelet des souris surexprimant Bcl2.

Coupes sagittales de souris sauvages (+/+, en haut) et de souris surexprimant le gène Bcl-2 (Hu-Bcl-2, en bas). L'échelle est identique dans les deux images

tranches de cervelet d'animaux plus jeunes ou plus âgés entraîne une apoptose beaucoup moins importante. Cette apoptose massive à ce stade pourrait ainsi être le reflet d'une apoptose développementale qui interviendrait de façon naturelle *in vivo*.

L'ensemble de ces données suggère qu'une apoptose développementale des cellules de Purkinje a lieu entre E15 et P5, qui pourrait intervenir à deux périodes: la première interviendrait autour de E15 (Ashwell, 1990) et une plus tardive entre P1 et P5.

L'apoptose neuronale survenant au cours du développement du système nerveux semble nécessaire à la formation d'un système nerveux fonctionnel. Elle peut être régulée par différents paramètres, tels que la présence de facteurs trophiques dans l'environnement neuronal, l'activité synaptique du neurone ou les afférences contactant ce neurone. Les travaux de Rita Levi-Montalcini et Viktor Hamburger (Hamburger et Levi-Montalcini, 1949) ont été parmi les premiers à montrer que l'élimination des neurones surnuméraires est contrôlée en partie par des facteurs trophiques. La survie des neurones dépendrait de leur capacité à accéder à une quantité suffisante de facteurs neurotrophiques (voir § II.4.1). Un autre paramètre pouvant influencer la survie neuronale au cours du développement est l'activité électrique de ce neurone (voir § II.4.2). L'apoptose développementale semble être également régulée par les afférences qui, à la suite de la dépolarisation des neurones, entraînent une augmentation de calcium intracellulaire qui pourrait ensuite réguler l'expression de facteurs trophiques tels que le BDNF.

En ce qui concerne le cervelet, l'influence des facteurs trophiques, de l'activité électrique et des afférences a été étudiée principalement en culture. De façon inattendue dans ce contexte, ces paramètres - classiquement associés à la survie des neurones - semblent influencer principalement le processus de différenciation de ces cellules (voir § II.5.1). Cette observation suggère que les processus de différenciation des cellules de Purkinje sont étroitement liés à leur survie.

II.3.2.2. Mort des cellules de Purkinje pendant le vieillissement normal.

De nombreuses études établissent une dégénérescence des cellules de Purkinje dans le cervelet au cours du vieillissement normal (Sturrock, 1989; Amenta *et al.*, 1994). Environ 14% des cellules de Purkinje montrent des « sphéroïdes axonales » ou « torpédos » (Baurle et Grusser-Cornehls, 1994) dans le cervelet au cours du vieillissement. Chez la souris C57BL/6,

la perte des cellules de Purkinje ne commence pas avant 18 mois, et atteint 25% à 24 mois (Doulazmi *et al.*, 1999). De plus, l'activité succinate-déshydrogénase - associée à l'activité mitochondriale - est également diminuée, suggérant que ces cellules ont un métabolisme énergétique insuffisant (Fattoretti *et al.*, 1998). Il semble que la perte des cellules de Purkinje au cours du vieillissement soit uniforme dans le cervelet (Sturrock, 1989). Les travaux de Bickford (Bickford *et al.*, 2000) suggèrent que les déficits cérébelleux sont moindres chez les souris nourries sous un régime riche en antioxydants, suggérant que la dégénérescence des cellules de Purkinje est liée au stress oxydatif intervenant de façon plus importante au cours du vieillissement (Bickford *et al.*, 2000). Cependant, des études menées sur des rats âgés de 42 mois montrent au contraire que le nombre de cellules de Purkinje ne diminue pas au cours du vieillissement (Bakalian *et al.*, 1991).

II.3.3. Mort non physiologique des cellules de Purkinje

II.3.3.1. Mutations spontanées entraînant une perte des cellules de Purkinje chez la souris (exemples).

Les cellules de Purkinje étant la seule efférence du cortex cérébelleux, leur perte entraîne un dysfonctionnement important des fonctions faisant intervenir le cervelet, et qui se traduit au niveau comportemental par une ataxie et des tremblements. L'ataxie est caractérisée par des difficultés à réaliser des mouvements correctement coordonnés, ce qui se traduit par des mouvements saccadés et imprécis et des troubles de l'équilibre. Les connaissances sur le fonctionnement du cervelet dans la réalisation motrice ont été acquises, entre autres, par les études sur les mutants murins spontanés, modèles d'ataxie cérébelleuse.

L'apparence du cervelet après la mort des cellules de Purkinje dépend de l'âge de la mort de ces cellules. Alors que la mort de cellules de Purkinje dans un cervelet adulte ne va pas entraîner de modification dans l'organisation du cervelet, la mort de ces cellules dans le cervelet néonatal a pour conséquence une diminution de la taille du cervelet. En effet, la perte des cellules de Purkinje dans le cervelet en développement affecte la prolifération ou la survie d'autres types cellulaires dans le cervelet (grains, noyaux profonds, ...; Wassef *et al.*, 1986; Ghetti *et al.*, 1987; Triarhou *et al.*, 1987) mais aussi hors du cervelet, en particulier les neurones de l'olive inférieure (Ghetti *et al.*, 1987; Shojaeian *et al.*, 1988; Triarhou et Ghetti, 1991).

Les gènes dont les mutations connues entraînent une perte des cellules de Purkinje codent diverses protéines telles que des canaux ioniques (canal calcium $\alpha 1a$ chez les mutants *tottering* et *leaner* (Doyle *et al.*, 1997), canal calcium $\alpha 2\delta 2$ chez *ducky* (Barclay *et al.*, 2001), canal potassique GIRK2 chez *weaver* (Patil *et al.*, 1995), canal calcium $\gamma 2$ chez *stargazer* (Letts *et al.*, 1998) et canal GluR $\delta 2$ chez *Lurcher* (Zuo *et al.*, 1997)), des facteurs de transcription (ROR α chez *staggerer*; Hamilton *et al.*, 1996, et voir §I et §II.6), des protéines impliquées dans l'adhésion ou la migration cellulaire (reelin chez le mutant *reeler* (D'Arcangelo *et al.*, 1995), Unc-5 chez le mutant *rcm* (*Rostral cerebellar malformation*; (Ackerman *et al.*, 1997)), ou d'autres protéines de fonction variée telles que Nna1 (une ATP/GTP binding protein) chez le mutant *pcd* (*Purkinje cell degeneration*; Fernandez-Gonzalez *et al.*, 2002), Wnt-1 chez *swaying* (Thomas *et al.*, 1991), protéine de transfert du phosphatidyl-inositol chez *wasted* (Chambers *et al.*, 1998). Bien que de nombreuses mutations ont été caractérisées ces dernières années, la cause génétique d'autres mutants cérébelleux reste inconnue (mutants *agitans*, *hyperspiny*, *tambaleante*, *nodding*, *nervous*, ...).

II.3.3.2. Mort pathologique des cellules de Purkinje: les ataxies chez l'Homme.

De nombreuses ataxies ont été décrites chez l'Homme et quelques unes sont brièvement décrites dans ce paragraphe.

- Ataxies spinocérébelleuses

Les ataxies spinocérébelleuses (SCA pour *spinocerebellar ataxia*) sont un groupe hétérogène de maladies héréditaires dont la caractéristique principale est une ataxie. Sept formes d'ataxie spinocérébelleuse (SCA1 à SCA7) ont été décrites chez l'Homme et résultent d'une expansion de triplets CAG entraînant une expansion poly-glutamine dans les protéines résultantes. Ces mutations conduisent à une perte des cellules de Purkinje, accompagnée dans certains cas de la dégénérescence d'autres neurones, en particulier dans le pont. L'ataxie familiale dominante la plus répandue au monde est l'ataxie spinocérébelleuse de type 3 (SCA3, ou maladie de Machado-Joseph - MJD), due à une expansion de triplets CAG dans le gène codant la protéine *MJD1* ou *ataxin-3*, une protéine ubiquitaire de fonction inconnue (Ichikawa *et al.*, 2001). Par ailleurs, SCA6 est causée par une expansion de triplets CAG dans le canal calcique $\alpha 1a$, dont la perte de fonction chez les mutants murins *leaner* et *tottering* ou

chez la souris chez laquelle le gène est inactivé présentent le même phénotype (Fletcher *et al.*, 1996; Doyle *et al.*, 1997).

- Maladie de Niemann-Pick

Les maladies de Niemann-Pick, classées en différents types A/B ou C, présentent comme caractéristique neuropathologique majeure une dégénérescence des cellules de Purkinje. La maladie Niemann-Pick de type A/B (NPAB) est une maladie lysosomale héréditaire, autosomique récessive, causée par une déficience de l'activité sphingomyelinase. La souris inactivée pour le gène codant la sphingomyelinase, modèle de la NPAB (Horinouchi *et al.*, 1995; Otterbach et Stoffel, 1995), se développe normalement et présente un phénotype ataxique progressif dès 8 semaines, et meurent à 6-8 mois. La maladie de Niemann-Pick de type C1 est une maladie héréditaire, autosomique récessive due à une anomalie de stockages des lipides, liée à un défaut de l'homéostasie et du transport intracellulaire du cholestérol (Pentchev *et al.*, 1986a, b; Shamburek *et al.*, 1997).

- Maladie de Menkes

La maladie de Menkes, ou syndrome "kinky hair", est une maladie récessive liée au chromosome X (Menkes *et al.*, 1962). Le gène muté dans cette maladie est une protéine de transport du cuivre/ATPase (Chelly *et al.*, 1993; Mercer *et al.*, 1993; Vulpe *et al.*, 1993). La pathologie est due à un défaut d'absorption du cuivre (hypocuprémie) entraînant la séquestration du cuivre dans l'intestin, le rein et le tissu conjonctif, associé à une sévère déficience en cuivre dans le système nerveux central (Camakaris *et al.*, 1979; Mann *et al.*, 1979; Yoshimura, 1994). Dans le système nerveux central, les pertes neuronales associées à une gliose, interviennent principalement dans le cortex cérébral, le thalamus et le cervelet (Troost *et al.*, 1982). L'hypoplasie cérébelleuse reflète une perte des cellules de Purkinje et une perte des grains du cervelet (Williams *et al.*, 1978; Iwata *et al.*, 1979). Il a été suggéré que la déficience en cuivre dans le SNC pourrait conduire à une déficience en activité Cu/Zn superoxyde dismutase (SOD1), qui entraînerait un stress oxydatif pouvant mener à une neurodégénérescence.

- L'Ataxie téléangiectasie (AT)

L'AT est une maladie autosomique récessive caractérisée dans sa forme typique par une ataxie cérébelleuse progressive, des téléangiectasies, une immunodéficience, un

vieillesse précoce et une sensibilité accrue aux radiations. L'ataxie est liée à une perte massive des cellules de Purkinje, mais aussi à la neurodégénérescence des grains et des neurones olivaires (Aguilar *et al.*, 1968; Boder, 1975; Paula-Barbosa *et al.*, 1983). La mutation dans le gène *atm* (AT-mutated) est responsable de cette maladie. ATM code une protéine impliquée dans la détection de la cassure de double-brins de l'ADN, processus indispensable à la réparation de l'ADN à la suite de l'exposition à des radiations par exemple. Le stress oxydatif a été impliqué de façon cruciale dans cette pathologie y compris pour la dégradation des cellules de Purkinje (pour revues, voir Barzilai *et al.*, 2002; Watters, 2003).

II.4. Différenciation des cellules de Purkinje

Nous nous intéresserons plus particulièrement à la différenciation des cellules de Purkinje, mais aussi à celle des grains car toutes deux sont étroitement liées. Par soucis de clarté dans le texte, nous distinguerons dans les cellules de Purkinje deux processus de différenciation - pourtant indissociables - dans cette partie: nous nous intéresserons dans un premier paragraphe à la "différenciation biochimique" des cellules de Purkinje, à savoir l'acquisition de l'expression des marqueurs des cellules de Purkinje, et dans un deuxième paragraphe, nous évoquerons la "différenciation morphologique" qui concerne la différenciation de l'arbre dendritique.

La cellule de Purkinje du cervelet est l'un des neurones le plus spectaculaire. Outre sa taille, la cellule de Purkinje se distingue des autres neurones par son arborisation dendritique extrêmement développée et orientée (voir § III.1.1.2). Les cellules de Purkinje établissent des synapses avec les axones des grains et cette interaction semble intervenir de façon cruciale dans l'élaboration de leur arbre dendritique.

II.4.1. Différenciation "biochimique" des cellules de Purkinje

Les cellules de Purkinje du cervelet dérivent d'un pool fondateur dans le métencéphale antérieur. Les précurseurs des cellules de Purkinje entament leurs dernières mitoses entre E10 et E13 (Miale et Sidman, 1961). Les cellules post-mitotiques migrent de la zone germinative vers l'ébauche cérébelleuse, en suivant probablement des guides de glie radiaire, où elles s'agrègent pour former une couche de 10 à 15 cellules d'épaisseur, près de la surface du cervelet. Cette couche des cellules de Purkinje se subdivise en faisceaux ("clusters") de phénotype moléculaire caractéristique (Hawkes et Eisenman, 1997; Herrup et Kuemerle, 1997; Armstrong et Hawkes, 2000). Les fibres grimpantes et les fibres moussues entrent ensuite dans le cervelet et contactent des faisceaux de cellules de Purkinje spécifiques, établissant ainsi une topographie des afférences (Mason et Gregory, 1984; Armstrong et Hawkes, 2000).

Les "clusters" de cellules de Purkinje se dispersent alors selon l'axe rostro-caudal autour de la naissance pour former une couche monocellulaire de bandes sagittales. La dispersion des clusters nécessite un changement des propriétés d'adhésion cellulaire entre les cellules de Purkinje, médiée par les voies de signalisation reelin-Dab1 (Howell *et al.*, 1997;

Sheldon *et al.*, 1997; Gallagher *et al.*, 1998), cadhérine (Gilmore et Herrup, 2000) et intégrine (Dulabon *et al.*, 2000). La dispersion des cellules de Purkinje étant rostro-caudale, les clusters de Purkinje sont donc transformés en bandes parasagittales.

Après la naissance, la plupart des marqueurs embryonnaires des clusters disparaissent ou sont exprimés de façon ubiquitaire (par exemple la calbindine), ou sont nouvellement exprimés (par exemple la zebrine II, (Lannoo *et al.*, 1991) et la parvalbumine (Endo *et al.*, 1985)).

II.4.2. Différenciation dendritique des cellules de Purkinje

Par des expériences de traçage à la peroxydase de Raifort et de microscopie électronique, Armengol et Sotelo (1991) ont décrit le développement dendritique des cellules de Purkinje chez le rat (figure 32). Jusqu'à la fin de leur migration, la morphologie des cellules de Purkinje est très peu développée (morphologie bipolaire caractéristique des neurones en migration). Les cellules de Purkinje entament ensuite un processus de régression de leurs prolongements dendritiques, avant de développer l'arbre dendritique terminal.

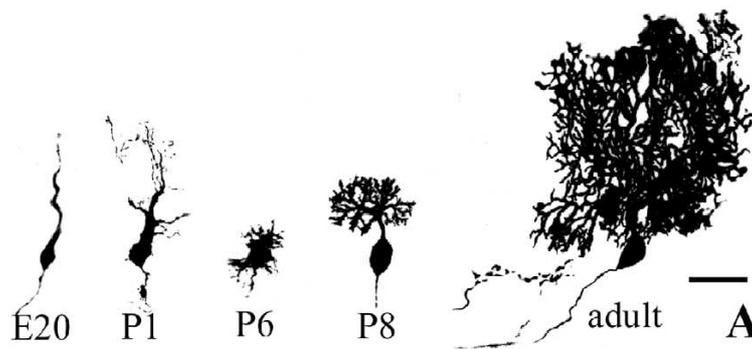


Figure 32: Différenciation des cellules de Purkinje. Les cellules de Purkinje sont visualisées de la fin de leur migration radiale (E20) jusqu'à l'adulte. Les cellules de Purkinje à P1 subissent une rétraction des dendrites jusqu'à P6, avant d'élaborer l'arbre dendritique terminal à partir de P6. D'après Armengol et Sotelo, 1991.

L'interaction avec les afférences est essentielle au développement de l'arborisation dendritique des cellules de Purkinje. Des études *in vitro* (Baptista *et al.*, 1994) ont montré que les premiers stades du développement des cellules de Purkinje peuvent avoir lieu indépendamment de toute interaction cellulaire. L'activité synaptique entre les fibres parallèles et les cellules de Purkinje est impliquée dans la différenciation de l'arbre

dendritique des cellules de Purkinje via les récepteurs ionotropiques non-NMDA et les récepteurs métabotropiques (Hirai et Launey, 2000).

II.4.2.1. Développement dendritique précoce.

Bien que les cellules de Purkinje naissent au 13^{ème} jour de développement chez la souris, le développement de leur arbre dendritique commence peu après la naissance. Le développement des cellules de Purkinje commence par l'élaboration de leur axone qui se projette vers les noyaux profonds du cervelet et vers les noyaux vestibulaires. Dès E18, les cellules de Purkinje ont une morphologie polarisée: l'axone émane d'un pôle alors qu'à l'autre pôle émane un prolongement dendritique pas encore branché. Ramón y Cajal, en 1926, a qualifié ce stade "fusiforme" (Ramón y Cajal, 1926), qui a été par la suite mieux caractérisé par Armengol et Sotelo (1991). Durant la première semaine après la naissance, la cellule de Purkinje va subir d'importants remodelages dendritiques.

A la fin de leur migration, les cellules de Purkinje sont fusiformes "simples", soit une morphologie bipolaire. Quelques branchements latéraux émergent ensuite du prolongement dendritique: la cellule de Purkinje est alors qualifiée "fusiforme complexe". Par la suite, de petites dendrites somatiques vont alors s'étendre dans toutes les directions, se brancher, croître, alors que le prolongement dendritique d'origine va régresser. La cellule de Purkinje apparaît alors de moins en moins polarisée: elle est caractéristique de l'âge P4-P6 et est qualifiée de "cellule étoilée avec des dendrites non orientées" (Ramón y Cajal, 1911) ou stade des dendrites "atrophiques-régressives" portant des prolongements courts et nombreux: les expansions périsonomatiques. A ce stade, les cellules de Purkinje sont alignées en une monocouche dans le cervelet. L'arborisation dendritique des cellules de Purkinje, comportant de nombreuses épines, se développe ensuite (à partir de P10 chez le rat) puis s'étend dans toute l'épaisseur de la couche moléculaire pour s'arrêter à la surface piaie.

Durant toute cette phase de remodelage dendritique, les cellules de Purkinje établissent des synapses avec les fibres grimpanes qui les contactent dès E19 chez la souris (Morara *et al.*, 2001). Les fibres grimpanes sont alors en position périsonomatique (Sotelo *et al.*, 1984; Mason *et al.*, 1990). Ces stades précoces du développement dendritique des cellules de Purkinje, qui ont lieu pendant la première semaine de développement, sont donc caractérisés par le remodelage dendritique et la connexion concomitante des fibres grimpanes. A ce stade, les fibres parallèles commencent à se développer et établissent

quelques synapses immatures sur les dendrites de cellules de Purkinje (Altman, 1972a, b) dont on peut enregistrer quelques réponses électrophysiologiques (Woodward *et al.*, 1971).

II.4.2.2. Développement de l'arbre dendritique.

Après la première semaine post-natale, et jusqu'à la quatrième semaine environ, le développement dendritique des cellules de Purkinje entre dans une nouvelle phase caractérisée par une élongation dendritique rapide et une synaptogenèse intense entre les cellules de Purkinje et les fibres parallèles (voir figure 33). Ce stade "d'orientation et d'aplanissement de l'arbre dendritique" (Ramón y Cajal, 1911) est celui pendant lequel l'arbre dendritique typique des cellules de Purkinje est généré, par une croissance ramifiée rapide des dendrites (Altman, 1972a, b; Hendelman et Aggerwal, 1980). Au début de cette phase, le pôle apical du soma des cellules de Purkinje commence à croître (formation d'un "cône apical") (Altman, 1972a) duquel un seul dendrite primaire émerge. Ce dendrite s'allonge et commence à se ramifier pour donner lieu à l'arbre dendritique typique des cellules de Purkinje.

Les synapses des fibres grimpantes subissent une translocation de leur position périsonotique vers leur position péri-dendritique définitive (Mason *et al.*, 1990). L'arbre dendritique des cellules de Purkinje est mature à l'âge d'un mois environ. A cet âge, la CGE a disparu et tous les grains ont atteint leur position finale, dans la couche interne sous la couche des cellules de Purkinje. Cette phase est une période de développement du cervelet pendant laquelle interviennent de façon concomitante divers processus. En effet, les cellules de Purkinje élaborent et orientent leur arbre dendritique, ce qui consiste en une croissance et un branchement rapide des dendrites, alors que les grains - qui continuent leur migration de la couche externe (qui disparaît progressivement) vers la couche interne - allongent leur axone qui forme les fibres parallèles qui établissent aussitôt des synapses avec l'arbre dendritique naissant des cellules de Purkinje. Parallèlement, les interneurones forment des synapses inhibitrices avec les cellules de Purkinje, alors que les fibres grimpantes réalisent leur translocation de leur localisation somatique vers leur position définitive dans la partie proximale de l'arbre dendritique des cellules de Purkinje (phase "grimpante" de l'innervation des fibres grimpantes), et la régression de la poly-innervation. Enfin, on observe pendant cette période la maturation des propriétés électrophysiologiques des cellules de Purkinje.

Les fibres parallèles contactent les prolongements dendritiques et forment des contacts synaptiques sur les épines dendritiques des cellules de Purkinje. Des synapses

immatures sont présentes dès le 5^{ème} jour après la naissance, et la synaptogenèse continue pendant toute la période de croissance dendritique, jusqu'à la fin de la 4^{ème} semaine après la naissance (Altman, 1972a).

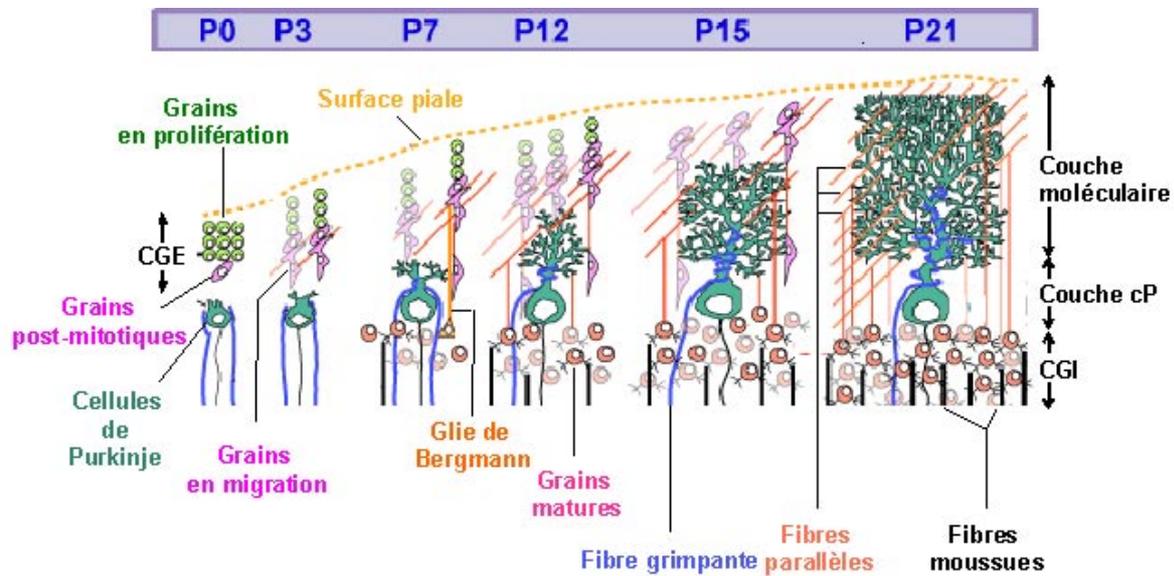


Figure 33: Différenciation et synaptogenèse du cortex cérébelleux de rat.

A partir de P21, les architectures au niveau cellulaire, au niveau des circuits neuronaux et au niveau des lobules ne montrent pratiquement aucune différence avec celles des animaux adultes.

II.4.3. Interactions avec la différenciation des autres cellules : cas des grains

II.4.3.1. Etapes de différenciation des grains

La différenciation des grains peut être divisée en trois étapes: l'initiation de leur différenciation, la croissance axonale et enfin la migration avec la formation de synapses (Hatten et Heintz, 1995). Après la naissance à P0, les grains prolifèrent massivement dans la couche germinative externe (EGL) jusqu'à P18. Leur longue période de prolifération (P0-P18) donne naissance à un très grand nombre de grains qui surpassent de loin le nombre de cellules de Purkinje - environ 250 grains pour une cellule de Purkinje dans le cervelet de souris adulte. Durant cette même période, les cellules post-mitotiques migrent radialement, guidées par les fibres de Bergmann (ou processus radiaire; Ramón y Cajal, 1911), et étendent

horizontalement en forme de T leur axone, appelé fibre parallèle (PF). Ces grains de la couche germinative externe traversent la couche moléculaire en développement et la couche de cellules de Purkinje pour former la couche des grains interne (IGL; figure 34). Les fibres parallèles s'étendent perpendiculairement au plan de l'arborisation dendritique des cellules de Purkinje et forment des synapses avec les épines dendritiques des cellules de Purkinje et les différents interneurons inhibiteurs: les cellules étoilées, de Golgi et en corbeille au fur et à mesure qu'elles deviennent matures.

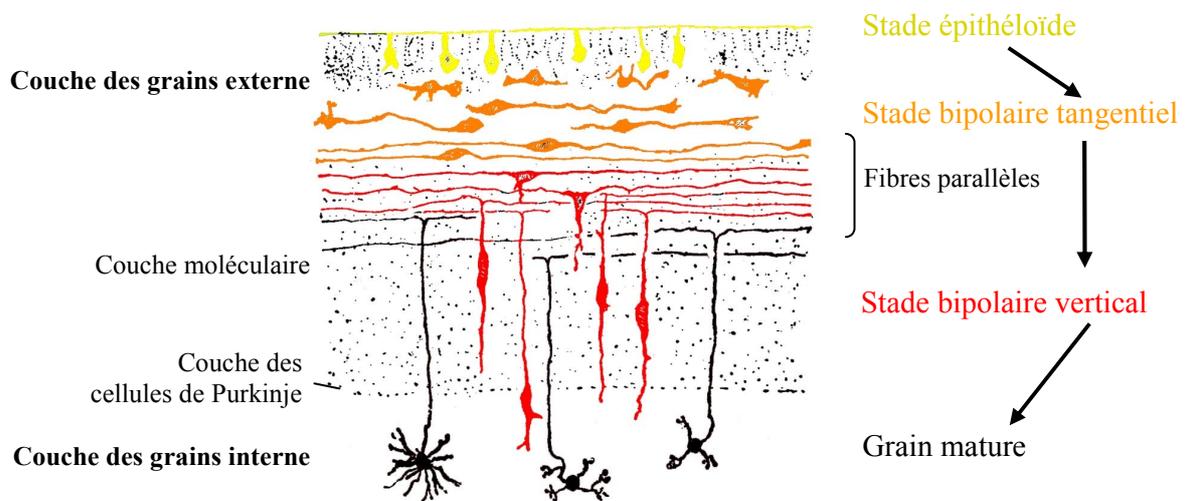


Figure 34: Schéma représentant la différenciation des grains en provenance de la couche des grains externe, d'après Ramon y Cajal (1911). Ramon y Cajal a distingué un premier stade de différenciation des grains post-mitotiques qualifié de "épithéloïde", puis un stade bipolaire tangentiel qui précède un stade bipolaire vertical. Les corps cellulaires des grains en stade bipolaire vertical traversent la couche moléculaire et la couche des cellules de Purkinje pour constituer la couche des grains internes, alors que les extensions neuritiques vont constituer les fibres parallèles.

La différenciation et la migration des grains nécessitent également l'interaction entre eux par le biais de récepteurs membranaires. Ceci a été démontré grâce à l'étude du mutant murin *weaver*, chez lequel les grains sont incapables de migrer. Les grains de génotype homozygote pour *weaver*, placés dans un cervelet sauvage, donc en présence de grains normaux, migrent et se différencient normalement.

Par ailleurs, le facteur NT-3 pourrait avoir une action dans la différenciation des grains, puisque l'application exogène de NT-3 accélère la sortie des grains de la couche externe (Doughty *et al.*, 1998) vers la couche interne.

II.4.3.2. Développement des cellules de Purkinje en l'absence de grains

L'irradiation aux rayons X de rats nouveaux-nés entraîne une diminution de 90% de l'innervation des cellules de Purkinje par les grains. Dans ces conditions, les cellules de Purkinje développent un arbre dendritique complexe, mais néanmoins non orienté et sans branchements dendritiques tertiaires (Altman et Anderson, 1972).

Ces caractéristiques sont retrouvées dans les cellules de Purkinje du mutant *weaver*, chez qui les grains, incapables de migrer, meurent avant d'établir les connexions avec les cellules de Purkinje (Rakic et Sidman, 1973). En effet, les cellules de Purkinje de ce mutant développent une arborisation dendritique de taille réduite, mais sans branchements dendritiques tertiaires. Les épines dendritiques, normalement localisées en majorité sur les branchements tertiaires de l'arborisation, sont observées chez ce mutant sur les branchements primaires et secondaires qui en sont normalement dépourvues. L'innervation des cellules de Purkinje par les fibres parallèles semble donc être nécessaire à la formation des branchements tertiaires ou quaternaires, mais ne semble pas intervenir dans la croissance initiale de l'arbre dendritique.

II.5. Facteurs influençant la différenciation et la survie des cellules de Purkinje

Divers facteurs pouvant influencer la survie des cellules de Purkinje ont été identifiés, le plus souvent dans des modèles de cultures de cellules de Purkinje. Il est intéressant de noter que pour nombre d'entre eux, ces paramètres semblent également exercer un rôle dans la croissance dendritique des cellules de Purkinje, suggérant que ces deux processus sont liés.

II.5.1. Influence des facteurs trophiques

Un certain nombre d'expériences indique que les cellules cibles jouent un rôle important dans la régulation du nombre de neurones afférents (pour revue, voir Oppenheim, 1981). La découverte du facteur de croissance neuronal (NGF, *Nerve Growth Factor*) a permis de montrer l'existence de facteurs sécrétés par la cible des neurones et d'avancer la théorie neurotrophique (Levi-Montalcini, 1949). Celle-ci postule que les neurones entrent en compétition pour un facteur trophique sécrété en quantité limitante par leur cible et que seuls survivent les neurones capables de capter une quantité suffisante de ce facteur trophique.

Le rôle des facteurs trophiques dans le processus de différenciation des cellules de Purkinje a été étudié dans des modèles de culture dissociée de cervelet. Le premier facteur trophique dont le rôle a été identifié est le NGF. L'ajout de NGF seul dans le milieu n'a pas d'effet sur la croissance des cellules de Purkinje. Par contre, l'ajout conjoint de NGF et d'agonistes de récepteurs métabotropiques du glutamate (Cohen-Cory *et al.*, 1993; Mount *et al.*, 1993) ou d'agonistes du récepteur muscarinique de l'acétylcholine (Mount *et al.*, 1994b) favorise la croissance des dendrites et augmente la survie des cellules de Purkinje. D'autres études ont montré un rôle similaire dans la survie ou la différenciation pour NT-3 (Mount *et al.*, 1994a), NT-4, BDNF et CNTF (Larkfors *et al.*, 1996), bien que controversé pour BDNF (pour revue, voir Kapfhammer, 2004) et NT-3 (Heuer et Mason, 2003).

L'IGF-1 semble également être un facteur clé de la survie des cellules de Purkinje (Chrysis *et al.*, 2001). Par exemple, la survie des cellules de Purkinje des souris mutantes *Pcd* (*Purkinje cell degeneration*) est améliorée par un haut niveau d'IGF-1 dans le sérum (Carro *et al.*, 2001). L'activité des neurotrophines semble jouer un rôle clé dans la survie des cellules de

2nde partie Cellules de Purkinje: Facteurs influençant la Survie et la Différenciation

Purkinje. Par exemple, l'injection chronique de GDNF conjointe ou non avec l'IGF-1 (Tolbert *et al.*, 2001; Tolbert et Clark, 2003) dans les rats *shaker*, entraîne un retard de la perte des cellules de Purkinje qui se produit chez ces animaux (Tolbert et Clark, 2000).

II.5.2. Rôles des Protéines Kinases C

L'activité des PKC (*Protein Kinase C*) a été identifiée comme étant un déterminant intracellulaire majeur de la croissance dendritique. L'activation des PKC dans des cellules de Purkinje en culture organotypique entraîne une sévère réduction de la croissance et des branchements dendritiques, alors que l'inhibition a l'effet inverse (pour revue, voir Kapfhammer, 2004). Par ailleurs, l'inhibition des PKC dans des tranches organotypiques de cervelet empêche la mort des cellules de Purkinje, montrant un rôle de cette molécule dans la survie des cellules de Purkinje (Ghoumari *et al.*, 2002).

II.5.3. Rôle de l'activité bioélectrique

Un autre paramètre pouvant influencer la survie neuronale au cours du développement est l'activité électrique de ce neurone (pour revue, voir Snider et Lichtman, 1996). A la suite de la dépolarisation des neurones, l'augmentation de calcium intracellulaire peut réguler l'expression de facteurs trophiques tels que le BDNF (Ghosh *et al.*, 1994), et ainsi influencer la survie des neurones.

En ce qui concerne les cellules de Purkinje, le rôle de l'activité électrique est, à ce jour, discuté. En effet, des études montrent que l'ajout de TTX sur les cellules de Purkinje en culture dissociée, qui empêche la conduction des potentiels d'action, entraîne une inhibition de la croissance de l'arborisation dendritique (Schilling *et al.*, 1991). Plusieurs études montrent que le blocage des récepteurs NMDA dans des cultures de cervelet de rat (Hirai et Launey, 2000; Adcock *et al.*, 2004) ou *in vivo* chez le poulet (Vogel et Prittie, 1995) conduit à une réduction de la taille de l'arbre dendritique des cellules de Purkinje. Cependant des études similaires - réalisées en grande partie dans des cultures organotypiques qui maintiennent une certaine intégrité des connexions entre neurones - n'ont pas réussi à mettre en évidence un effet de l'activité électrique sur la différenciation de l'arbre dendritique (pour revue, voir Kapfhammer, 2004). Peut-être les différences de résultats peuvent-elles être liées aux différents modèles cellulaires utilisés?

II.5.4. Influence des hormones thyroïdiennes

Le développement de l'arbre dendritique des cellules de Purkinje a été un des premiers exemples montrant le rôle important des hormones dans le développement des neurones. La déficience en hormones thyroïdiennes entraîne chez l'Homme le syndrome du "crétinisme", caractérisé par un sévère retard mental. L'hypothyroïdisme pendant le développement entraîne chez le rongeur d'importantes anomalies de développement des neurones, et en particulier des cellules de Purkinje. En effet, leur développement est retardé, leur taille, les branchements dendritiques, et le nombre de synapses sont réduits (Nicholson et Altman, 1972a, b; Lauder, 1978; Vincent *et al.*, 1982).

Les hormones thyroïdiennes agissent via l'activation des récepteurs nucléaires TR α 1 (*Thyroid hormone Receptor α 1*) et TR β . Contrairement aux effets de l'hypothyroïdisme induit par une carence en hormones, les souris chez lesquelles l'un et/ou l'autre des récepteurs ont été inactivés présentent un développement normal du cerveau, avec en particulier un arbre dendritique des cellules de Purkinje normal (Forrest *et al.*, 1991; Fraichard *et al.*, 1997; Gothe *et al.*, 1999). Cependant, la souris qui exprime un récepteur TR β muté sur le site de fixation de l'hormone (rendant ainsi impossible l'activation du récepteur par l'hormone) présente les anomalies de développement du cerveau et des cellules de Purkinje décrites pour les animaux hypothyroïdiens (Hashimoto *et al.*, 2001). Par ailleurs, les souris déficientes en TR α 1 sont protégées des effets de l'hypothyroïdie sur le développement du cervelet (Morte *et al.*, 2002). Le rôle des hormones thyroïdiennes et des récepteurs TR α 1 et TR β a également été étudié dans des cultures dissociées de cervelet, qui contiennent des cellules de Purkinje et des grains. L'ajout de T3 dans le milieu de culture favorise la croissance dendritique des cellules de Purkinje (Lindholm *et al.*, 1993), via l'activation des récepteurs TR α 1 exprimés par ces cellules (Heuer et Mason, 2003).

Ces résultats suggèrent que l'hormone thyroïdienne est nécessaire pour activer ses récepteurs, qui, en l'absence d'hormone, sont dans une forme "apo", et sont capables de réprimer la transcription de gènes cibles (voir §I.I.4). Les récepteurs TR, en l'absence d'hormone thyroïdienne, ont donc un effet inhibiteur sur la croissance dendritique des cellules de Purkinje. En condition d'euthyroïdie, la fixation de l'hormone sur son récepteur entraîne la levée de l'inhibition de la transcription, qui est nécessaire au développement normal du cervelet.

II.5.5. Influence des hormones stéroïdiennes

Outre les hormones thyroïdiennes, les hormones stéroïdiennes telles que la progestérone et les œstrogènes exercent un rôle dans la différenciation de l'arbre dendritique des cellules de Purkinje. Leur rôle dans la synaptogenèse dans l'hippocampe est décrit depuis de nombreuses années. Ces hormones sont synthétisées par les cellules de Purkinje elles-mêmes (Sakamoto *et al.*, 2002; Sakamoto *et al.*, 2003).

L'augmentation exogène de progestérone dans le fluide céphalorachidien ou dans un modèle *in vitro* en culture a montré un rôle positif de cette hormone sur la croissance des dendrites. Par ailleurs, le nombre d'épines dendritiques est augmenté après un traitement à la progestérone (Sakamoto *et al.*, 2002). Les effets des œstrogènes sont similaires à ceux de la progestérone (Sakamoto *et al.*, 2002). Les hormones stéroïdiennes semblent donc être des stimulateurs du développement des dendrites et des épines dendritiques des cellules de Purkinje.

Aucune étude ne décrit de rôle des hormones stéroïdiennes dans la survie des cellules de Purkinje. Le RU 486 (mifepristone), un antagoniste du récepteur de la progestérone, est un facteur de survie des cellules de Purkinje en culture organotypique (Ghoumari *et al.*, 2003). Cependant, les auteurs ont montré que l'action du RU 486 était indépendante du récepteur de la progestérone puisque la progestérone elle-même n'avait pas d'effet et parce que l'effet du RU 486 est maintenu dans des cultures de cervelet de souris qui n'expriment plus ce récepteur.

II.6. Rôle du récepteur nucléaire ROR α dans la survie et la différenciation des cellules de Purkinje.

De nombreuses études montrent une influence des hormones dans le développement. La plupart des fonctions hormonales sont médiées par des récepteurs nucléaires qui vont, en fonction de la fixation ou non de leur ligand (le plus souvent une hormone), réguler l'expression de gènes cibles.

De nombreux récepteurs nucléaires ont été identifiés indépendamment de leur ligand: c'est le cas des récepteurs dits "orphelins" qualifiés ainsi puisque leur clonage a précédé l'identification de leur fonction ou de leur ligand (voir § I.1.5). Par ailleurs, ces récepteurs nucléaires - tel T₃R - peuvent agir de façon active sur la régulation de la transcription indépendamment de la présence du ligand. L'étude de la régulation des récepteurs nucléaires, de leur expression ainsi que de leur fonction est donc d'une importance considérable pour une meilleure compréhension des divers processus dans lesquels sont impliqués ces récepteurs.

ROR α est un récepteur nucléaire qui exerce de nombreuses fonctions dans et hors du système nerveux (voir §I.4), et en particulier dans le développement et dans le vieillissement du cervelet (voir aussi §I.4.1).

Les fonctions de ROR α ont été étudiées en partie à l'aide du mutant *staggerer*. La mutation *staggerer* conduit à la délétion d'une partie de la protéine et semble entraîner la perte de fonction de la protéine ROR α (voir §I.5). Ces souris présentent une sévère ataxie, conséquence d'une neurodégénérescence massive dans le cervelet (voir § II.6.1). En effet, le cervelet adulte *Rora*^{sg/sg} est très atrophié et très peu folié : cette atrophie est due à l'absence précoce des cellules de Purkinje et au faible nombre des grains (Herrup, 1983). Par ailleurs, les cellules de Purkinje restantes présentent des anomalies de différenciation (voir § II.6.2).

II.6.1. Pertes neuronales chez le mutant *staggerer*

L'absence de ROR α conduit à des neurodégénérescences massives des cellules de Purkinje, mais également des grains et des neurones olivaires.

II.6.1.1. Cellules de Purkinje

ROR α semble être indispensable à la survie des cellules de Purkinje, qui sont affectées de manière intrinsèque par la mutation *staggerer*.

Les cellules de Purkinje commencent à exprimer ROR α dès E13, date à laquelle ces précurseurs deviennent post-mitotiques et quittent la zone ventriculaire (Goldowitz et Hamre, 1998; Gold *et al.*, 2003). Les travaux de Vogel et de ses collaborateurs (2000) suggèrent fortement que le cervelet des souris *Rora*^{sg/sg} semble normal jusqu'à E17.5, et que les cellules de Purkinje sont générées de façon normale mais commencent à mourir entre P0 et P5. Chez l'adulte, le nombre des cellules de Purkinje est très diminué, le déficit atteint 82% à 2 mois (Doulazmi *et al.*, 2001).

La mutation *staggerer* a longtemps été considérée comme récessive. Cependant, l'étude des souris hétérozygotes pour la mutation *staggerer* (*Rora*^{+/sg}) a montré un effet semi-dominant de cette mutation : au cours du vieillissement, les souris hétérozygotes *Rora*^{+/sg} présentent des pertes neuronales plus importantes que les souris *Rora*^{+/+}. Alors que le nombre des neurones cérébelleux est normal jusqu'à l'âge de 2 mois, il se produit ensuite une perte progressive des cellules de Purkinje, des grains et des neurones olivaires qui atteint 25 à 30% à l'âge de 12 mois (Zanjani *et al.*, 1992; Hadj-Sahraoui *et al.*, 1997). Bien que les souris aient un aspect clinique apparemment normal, elles présentent des déficits dans la réalisation de certains tests moteurs et dans les apprentissages moteur et spatial (Caston *et al.*, 1995; Caston *et al.*, 2003; Caston *et al.*, 2004).

II.6.1.2. Cellules granulaires

Les grains du cervelet n'expriment pas ROR α . La diminution du nombre de grains chez les mutants perte de fonction de ROR α semble être la conséquence de deux processus distincts:

- d'une part, une diminution de la prolifération des précurseurs des grains dans la couche germinative externe des grains.

2nde partie Cellules de Purkinje: Rôle de ROR α dans la survie et la différenciation

Dès la naissance, la CGE est d'épaisseur moins importante que chez les sauvages. En effet, les cellules de Purkinje contrôlent la prolifération des grains en synthétisant la molécule diffusible Sonic Hedgehog, signal mitogène pour les précurseurs des grains (Dahmane et Ruiz-i-Altaba, 1999; Wallace, 1999; Kenney *et al.*, 2003). Récemment, il a été montré que ROR α contrôle la transcription du gène codant pour Shh (Gold *et al.*, 2003 et voir § I.5). Ainsi, ces travaux suggèrent que les cellules de Purkinje dépourvues de ROR α fonctionnel n'envoient pas les signaux mitogènes de façon normale et la prolifération des grains en est affectée, conduisant à une diminution du nombre de grains post-mitotiques.

- d'autre part, une dégénérescence des grains par absence de leur cible.

L'absence des cibles des grains (ici les cellules de Purkinje) entraîne leur dégénérescence. Ce processus a été largement décrit et qualifié de "dégénérescence en cascade" (Sotelo et Changeux, 1974).

II.6.1.3. Autres neurones

Les neurones olivaires - afférences des cellules de Purkinje - sont également affectés par la mutation *staggerer*: leur nombre est normal à la naissance mais le déficit atteint 60% au 24^{ème} jour postnatal et se maintient à l'âge adulte (Blatt et Eisenman, 1985; Shojaeian *et al.*, 1985; Zanjani *et al.*, 1994). Par contre, le nombre des neurones des noyaux cérébelleux est normal.

Les autres régions du cerveau semblent normales, excepté le bulbe olfactif qui est atrophique (Monnier *et al.*, 1999).

II.6.2. Différenciation des cellules de Purkinje chez *staggerer*

Les cellules de Purkinje des souris *Rora*^{sg/sg} présentent des anomalies de différenciation. Ces anomalies concernent leur morphologie, mais aussi l'expression de protéines. En effet, les cellules de Purkinje survivantes chez l'adulte semblent immatures: leurs dendrites sont atrophiques et dépourvues de branchettes terminales et d'épines (Bradley et Berry, 1978; Landis et Sidman, 1978; Sotelo, 1978, 1990). De plus, l'expression de certains marqueurs tardifs tels que Pcp-2/L7 et calmoduline (Messer *et al.*, 1990; Hamilton *et al.*, 1996), est anormale. Par ailleurs, les cellules de Purkinje restent poly-innervées par les fibres

2nde partie Cellules de Purkinje: Rôle de ROR α dans la survie et la différenciation

grimpantes (Crepel *et al.*, 1980; Mariani et Changeux, 1980), poly-innervation qui régresse normalement pendant le développement (Mariani et Changeux, 1981a, b).

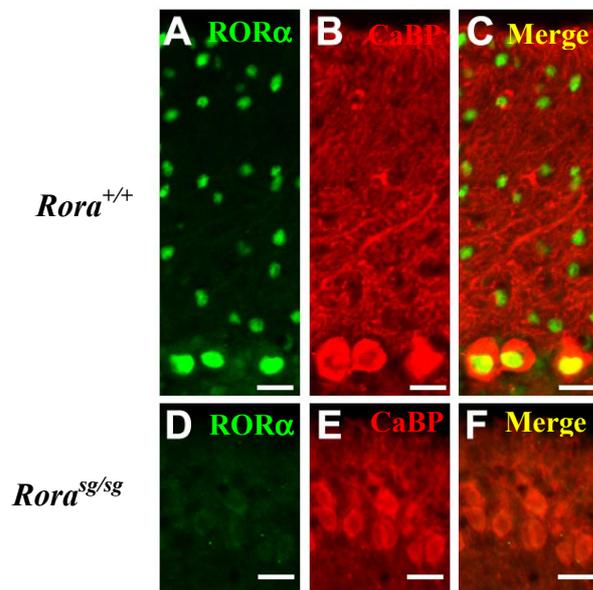


Figure 35: Cellules de Purkinje du mutant homozygote *staggerer*.

L'expression de ROR α dans le cervelet de souris *Rora*^{+/+} et *Rora*^{sg/sg} à P30 est révélée par immunomarquage en vert (A,D). Les cellules de Purkinje sont révélées en rouge par l'immunomarquage de la calbindine en rouge (B, E). Les images C et F montrent la superposition des images A-B et D-E respectivement. *Contribution personnelle.*

De plus, l'analyse de la morphologie des cellules de Purkinje de l'hétérozygote *staggerer* montre une atrophie des dendrites au cours du vieillissement (Doulazmi *et al.*, 1999; Hadj-Sahraoui *et al.*, 2001), beaucoup plus importante que chez les témoins.

En conclusion, nous avons vu que ROR α est impliqué de façon cruciale dans le développement du cervelet.

Cependant, la survie et la différenciation des cellules de Purkinje étant deux processus dépendants l'un de l'autre, les travaux publiés ne permettent pas de déterminer:

- si ROR α exerce un rôle propre dans la survie des cellules de Purkinje, et entraîne en conséquence les anomalies de différenciation des cellules de Purkinje (liées par exemple à l'absence des grains montrés nécessaires au processus de différenciation des cellules de Purkinje).
- Si ROR α exerce un rôle propre dans la différenciation des cellules de Purkinje du cervelet, entraînant une mort de ces cellules anormalement différenciées dans le cervelet en développement.

RESULTATS EXPERIMENTAUX

I. ROLE DE ROR α DANS LA SURVIE NEURONALE

La perte de fonction de la protéine ROR α chez les mutants *Rora*^{sg/sg} et *Rora*^{+/+} entraîne chez la souris la perte de la quasi-totalité des cellules de Purkinje pendant le développement post-natal du cervelet, alors que les hétérozygotes *Rora*^{+/-} présentent une perte des cellules de Purkinje accrue au cours du vieillissement. Ces données suggèrent que ROR α pourrait exercer un rôle neuroprotecteur dans les cellules de Purkinje pendant le développement, mais également pendant le vieillissement puisque la demi-dose de protéines ROR α entraîne une survie moindre des cellules de Purkinje au cours du vieillissement.

Afin de tester si ROR α pouvait exercer un rôle dans la survie neuronale, nous avons étudié, en culture, la survie de neurones qui surexpriment ROR α .

Afin de réaliser la surexpression de ROR α , nous disposions d'une séquence d'ADN complémentaire (ADNc) codant pour l'isoforme ROR α 1 humaine (reçue du Dr Bart Staels, UR545 INSERM, Institut Pasteur de Lille). Les neurones sont des cellules difficiles à transfecter. Alors que l'efficacité de la surexpression d'un transgène par transfection transitoire d'un plasmide s'est révélée faible dans les neurones corticaux, elle s'est révélée quasi-nulle dans les cellules de Purkinje. J'ai donc choisi de construire un vecteur lentiviral recombinant pour réaliser une surexpression efficace de ROR α (Lenti-hROR α 1). Cette technique s'est révélée très efficace: dans nos conditions expérimentales, la totalité des neurones corticaux en culture, ainsi que la grande majorité des cellules de Purkinje dans des cultures organotypiques de cervelet sont transduites par le vecteur lentiviral.

Dans une première étude, nous avons étudié la survie de neurones corticaux surexprimant ROR α en culture primaire. Les résultats de cette étude sont décrits dans une première partie et font l'objet de l'article I (voir §I.1). Dans une seconde étude, alors que nous avons développé un outil permettant de surexprimer ROR α dans des cellules de Purkinje, nous avons analysé leur survie dans un modèle d'apoptose développementale de ces cellules en culture (Dusart *et al.*, 1997; Ghoumari *et al.*, 2000). Cette étude est décrite dans le §I.2.

I. Rôle de ROR α dans la survie neuronale:
1. Article I - La surexpression de ROR α protège les neurones corticaux
d'une apoptose induite par un stress oxydatif

**I.1. La surexpression de ROR α protège les neurones corticaux
d'une apoptose induite par un stress oxydatif**

Article I: *HROR α 1 overexpression protects neurons against oxidative stress-induced apoptosis.*

Fatiha Boukhtouche, Guilan Vodjdani, Christopher I. Jarvis, Joelle Bakouche, Bart Staels, Jacques Mallet, Jean Mariani, Yolande Lemaigre-Dubreuil & Bernard Brugg.

Journal of Neurochemistry, sous presse, 2006.

Afin de tester si ROR α pouvait exercer un rôle dans la survie neuronale, nous avons étudié, en culture, la survie de neurones corticaux qui surexpriment ROR α . Nous avons choisi d'étudier ce rôle dans des neurones corticaux en culture primaire car ce modèle nous permettait d'accéder à une population relativement pure de neurones, et qui permettait de faire aisément des analyses globales sur les neurones (RT-PCR, cytométrie de flux, etc...). En effet, les méthodes de cultures de cellules cérébelleuses ne permettent pas d'obtenir de culture pure de cellules de Purkinje. De plus, en culture primaire ou *in vivo*, les neurones corticaux expriment ROR α de façon endogène, suggérant qu'ils disposent de la machinerie cellulaire capable d'interagir avec ROR α . La survie de ces neurones - surexprimant ou non ROR α - a été évaluée en réponse à des traitements pro-apoptotiques, tels que le c₂-céramide (second messenger intervenant dans l'apoptose neuronale), l'eau oxygénée (un puissant producteur de radicaux libres OH \bullet) ou le peptide A β (25-35) (peptide mimant la toxicité des peptides amyloïdes A β dans la maladie d'Alzheimer).

L'évaluation de la survie des neurones montre que la surexpression de ROR α exerce un rôle neuroprotecteur dans les neurones corticaux en culture.

L'induction de la mort par les agents pro-apoptotiques utilisés dans cette étude semble être en partie liée à une production accrue de radicaux libres. Afin de déterminer si ROR α protège les neurones en diminuant le stress oxydatif causé par ces inducteurs pro-

I. Rôle de ROR α dans la survie neuronale:

1. Article I - La surexpression de ROR α protège les neurones corticaux d'une apoptose induite par un stress oxydatif

apoptotiques, nous avons évalué la production de radicaux libres ainsi que l'expression d'enzymes impliqués dans le métabolisme des radicaux libres.

Par quantification de l'intensité moyenne de fluorescence émise par une sonde spécifique en cytométrie de flux, nous montrons que la quantité de radicaux libres détectée est diminuée dans les neurones qui surexpriment ROR α . De plus, nous montrons par PCR en temps réel que l'expression de deux enzymes impliqués dans la clairance des radicaux libres (Glutathion peroxydase 1 et peroxiredoxine 6) est augmentée dans les neurones surexprimant ROR α . L'augmentation de l'expression de ces deux enzymes semble partiellement médier l'effet neuroprotecteur de ROR α puisque la neuroprotection est diminuée de façon significative lorsque l'expression de l'un ou l'autre des enzymes (ou des deux simultanément) est diminuée par la technique de si-RNA.

Les neurones corticaux surexprimant hROR α 1 survivent donc mieux à un stress induit par un traitement conduisant à une production accrue de radicaux libres. Cette neuroprotection semble être liée à une diminution de la production de radicaux libres, ou à une augmentation de la clairance des radicaux libres.

Ces résultats montrent que ROR α est impliqué dans l'homéostasie redox des neurones et suggèrent que *in vivo*, ROR α peut exercer une fonction similaire. Ainsi l'expression de ROR α pourrait permettre une meilleure protection cellulaire contre le stress oxydatif.

Human retinoic acid receptor-related orphan receptor α 1 overexpression protects neurones against oxidative stress-induced apoptosis

Fatiha Boukhtouche,* Guilan Vodjdani,† Christopher I. Jarvis,* Joelle Bakouche,* Bart Staels,‡ Jacques Mallet,† Jean Mariani,* Yolande Lemaigre-Dubreuil* and Bernard Brugg*

*Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, UMR 7102 – Neurobiologie des Processus Adaptifs (NPA) CNRS, Paris, France

†UR545 INSERM, Institut Pasteur de Lille, Faculté de Pharmacie, Université de Lille II, Lille, France

‡Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, UMR 7091 – Génétique moléculaire de la Neurotransmission et des Neurodégénératifs (LGN) CNRS, Paris, France

Abstract

Retinoic acid receptor-related orphan receptor α (ROR α) is a transcription factor belonging to the superfamily of nuclear receptors. Disruption of the *Rora* gene in the mouse results in a defect in the development of Purkinje cells leading to a cerebellar atrophy, which suggests a neuroprotective role for ROR α . To test this hypothesis, the survival rate of lentiviral-mediated human ROR α 1-overexpressing neurones has been evaluated in response to different stressors disturbing the redox homeostasis, such as β -amyloid peptide, c_2 -ceramide and H_2O_2 . We show that overexpression of human ROR α 1 provides neuroprotection by increasing the expression of the

antioxidant proteins glutathione peroxidase 1 and peroxiredoxin 6, leading to a reduction in the accumulation of stress-induced reactive oxygen species. We further demonstrate that the neuroprotective effect of ROR α is predominantly mediated by glutathione peroxidase 1 and peroxiredoxin 6. These results suggest a new role for ROR α in the control of the neuronal oxidative stress and thus represents a new transcription factor of interest in the regulation of reactive oxygen species-induced neurodegenerative processes during ageing. **Keywords:** apoptosis, lentivirus, neuroprotection, oxidative stress, retinoic acid receptor-related orphan receptor α .

J. Neurochem. **96**, 1778–1789.

There is accumulating evidence that a proper balance between oxidants and antioxidants is of systemic importance for health and longevity. Homeostasis of redox status is normally maintained by intracellular regulatory molecules and enzymes such as glutathione, thioredoxin, catalase, superoxide dismutase and peroxidases. Exposure to oxidants can lead to oxidative stress wherein the antioxidant status of the cell is thrown out of balance and may lead to a variety of symptoms including apoptosis. How the expression of these enzymes, implicated in homeostasis of redox status, is regulated and which factors are involved is still poorly understood.

Retinoic acid receptor-related orphan receptor α (ROR α) is a member of the superfamily of the nuclear receptors (Giguere 1999). Initially described as an orphan receptor, ROR α had long been considered a constitutive activator of transcription in the absence of exogenous ligand (Atkins *et al.* 1999; Harris *et al.* 2002). Recently, however, cholesterol and 7-dehydrocholesterol were shown to be natural

ligands of the transcription factor ROR α (Kallen *et al.* 2002; Bitsch *et al.* 2003).

Mutant mice lacking functional ROR α protein (Hamilton *et al.* 1996; Steinmayr *et al.* 1998) develop a severe cerebellar ataxia due to a massive cerebellar neurodegeneration (Sidman *et al.* 1962). Loss of function of the ROR α

Received September 19, 2005; revised manuscript received November 5, 2005; accepted December 16, 2005.

Address correspondence and reprint requests to Fatiha Boukhtouche, Laboratoire Neurobiologie des Processus Adaptatifs, UMR 7102, Université P. & M. Curie-CNRS, 9 quai Saint Bernard, 75005 Paris, France. E-mail: Fatiha.Boukhtouche@snv.jussieu.fr or fatiha.boukhtouche@gmail.com

Abbreviations used: A β , β -amyloid peptide; GFP, green fluorescent protein; Gpx, glutathione peroxidase; hROR α , human retinoic acid receptor-related orphan receptor α ; Prx, peroxiredoxin; ROR α , retinoic acid receptor-related orphan receptor α ; ROS, reactive oxygen species; si-RNA, small interfering RNA.

protein causes a cell-autonomous developmental defect in the Purkinje cells (Herrup 1983) leading to the absence of approximately 80% of these neurones by 2 months of age and a severe cerebellar atrophy (Doulazmi *et al.* 2001). A slow and progressive loss of Purkinje cells and an atrophy of the dendrites in the surviving cells, as well as an important loss of granule cells and olivary neurones (Zanjani *et al.* 1992; Doulazmi *et al.* 1999; Hadj-Sahraoui *et al.* 2001), develop with age in the cerebellum of heterozygous *staggerer* mice (*Rora*^{sg/+}). The *staggerer* mutant mouse also has a variety of other age-related phenotypes including muscular atrophy, immunodeficiencies, osteoporosis and atherosclerosis (for review, see Boukhtouche *et al.* 2004 and Jarvis *et al.* 2002), suggesting a protective role for ROR α against ageing processes in general.

Although the molecular mechanisms underlying the cerebellar *staggerer* phenotype are not yet understood, the massive and the progressive neurodegeneration observed, respectively, in homozygous mutants (*Rora*^{sg/sg}) and in heterozygous *staggerer* animals (*Rora*^{sg/+}) suggest a neuroprotective role for ROR α .

The neuronal loss occurring in Alzheimer's disease has been associated with accumulation and aggregation of β -amyloid peptide (A β) (Forloni 1993). Subsequently, A β and a synthetic peptide homologous to residues 25–35 (A β 25–35) have been shown to induce apoptosis in neurones (Forloni *et al.* 1993; Loo *et al.* 1993). Ceramide is a second messenger generated by sphingomyelinase-dependent hydrolysis of sphingomyelin in response to a number of agents, including tumour necrosis factor α and Fas ligand (Hannun 1996). Several studies link the pro-apoptotic effect of both c₂-ceramide and A β (25–35) to the production of H₂O₂ and the accumulation of reactive oxygen species (ROS) (Behl *et al.* 1994; Quillet-Mary *et al.* 1997) and subsequent activation of the c-Jun N-terminal Kinase/Stress Activated Protein Kinase (JNK/SAPK) pathway (Verheij *et al.* 1996; Morishima *et al.* 2001).

To determine whether ROR α has a role in neuronal death, we have overexpressed the human ROR α 1 (hROR α 1) isoform in neurones by transient transfection of a plasmid encoding hROR α 1 (pSG5-hROR α 1) or by infecting cultures with a lentiviral-derived vector encoding hROR α 1 (Lenti-hROR α 1). Lentiviral gene transfer has proven a powerful method to transduce our neurones in culture with great efficiency (almost 100%). hROR α 1-overexpressing neurones were then exposed to three different apoptotic stimuli, A β , c₂-ceramide and H₂O₂, and their survival rate was assessed. Herein we demonstrate that overexpression of hROR α 1 protects cortical neurones from apoptosis; survival after exposure to apoptotic stimuli is significantly increased for neurones overexpressing hROR α 1.

Neuroprotection created by the overexpression of hROR α 1 suggests a new role for ROR α in the control of neuronal survival by the reduction of ROS content.

Materials and methods

Materials

c₂-ceramide (*N*-acetyl sphingosine, Biomol Research Laboratory Weil am Rhein, Germany) was prepared as a 25 mM stock in ethanol, and A β (25–35) (Bachem, TEBU-BIO SA, Switzerland) and H₂O₂ (Prolabo, St-Germain LaPrade, France) were both prepared as a 1 mM stock in sterile double-distilled water and incubated in the culture media as described. 5-(and -6) chloromethyl-2'-7'-dichlorohydromethylfluorescein diacetate, acetyl-ester (CM-H₂DCFDA) (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) was diluted as a 1 mM stock in dimethylsulphoxide, 7-amino actinomycin D (Sigma, St Louis, MO, USA) was prepared at 1 g/L in sterile double-distilled water, and Hoechst 33342 was purchased from Sigma.

DNA constructs

Lentivirus

The backbone of the lentiviral construct (pFlap) carries the DNA flap sequence (Zennou *et al.* 2001) and is deleted for the HIV-1 enhancer and promoter sequences in the U3 region of the 3' Long Terminal Repeat (LTR) (Sirven *et al.* 2001). The 1.6-kb hROR α 1 cDNA fragment was inserted into the pFlap Δ U3.PGK-WPRE transfer vector, placed under the control of the phosphoglycerate kinase promoter and followed by a 600-bp post-translational regulatory element WPRE (Zufferey *et al.* 1999).

Plasmids

The hROR α 1 cDNA fragment was inserted into the pSG5 vector (Stratagene, La Jolla, CA, USA), under the control of the SV40 promoter.

Primary cultures of mouse cortex, infection and transient transfection

Primary cortical neurones were isolated from neocortices of embryonic day 14 mice as described previously (Willaime *et al.* 2001).

Infection

Cells (1.4×10^6) were infected immediately after cortical dissociation for 1 h at 37°C with the volume of viral stock (Lenti-hROR α 1 and Lenti-GFP) corresponding to 3.4×10^6 transducing units.

Plasmid transfection

Transfection was performed at 4 days *in vitro* with LipofectAMINE 2000[®] (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) as recommended by the manufacturer's protocol, with 1 μ g of plasmid encoding DsRed2 in the presence of 5 μ g of either the plasmid pSG5-hROR α 1 or the control plasmid pSG5. Transfection efficiency was over 5%.

Small interfering RNA preparation and transfections

Small interfering RNAs (si-RNAs) corresponding to *Gpx1* or *Prx6* genes were designed as recommended (Elbashir *et al.* 2001; Krichevsky and Kosik 2002) and annealed for duplex si-RNA by Eurogentec (Angers, France). The following gene-specific sequences were used: Si-Gpx1-1, sense 5'-GCAGUCUGGCAA-CUCCUAATT-3' and antisense 5' UUAGGAGUUGCCAGACUGCTT-3'; si-Gpx1-2, sense 5'-CCAGGAGAAUGGCAA-GAAUTT-3' and antisense 5'-AUUCUUGCCAUCUCCUGGTT-3'; Si-Prx6-1, sense 5'AGAGGAAUGUUAAGUUGAUTT-3' and

antisense 5'-AUCAACUUAACAUCCUCUTT-3'; and si-Prx6-2, sense 5'-GGAAGCCAAACAAUGUUUUCTT-3' and antisense 5'-GAAACAUGUUUGGCUUCCTT-3'. Transfections with si-RNA (50 nM) were performed using Lipofectamine 2000.

Recombinant lentiviral production, titrations and transduction efficiency

Stocks of lentiviral vector were prepared by transient cotransfection of HEK 293T cells with the p8.91 encapsidation plasmid (Δ Vpr Δ Vif Δ Vpu Δ Nef) (Zufferey *et al.* 1997), pHCMV-G and the recombinant gene transferring vector, as described previously (Zennou *et al.* 2000). Briefly, the supernatants were treated with DNaseI (Roche Diagnostic, Meylan, France) prior to ultracentrifugation and then resuspended in phosphate-buffered saline, aliquotted and stored at -80°C until use. The amount of p24 capsid protein was determined by the HIV-1 p24 ELISA antigen assay (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA). Virus from different virus stock productions averaged 150 ng/ μL of p24.

The titration of each vector stock was determined by infecting cells with increasing amounts of each lentiviral suspension. Cells were then directly plated in culture dishes as described above. Transducing units were calculated after 4 days in culture using the transducing units = fC_0V formula, where f is the frequency of Green Fluorescent Protein (GFP) or ROR α -positive cells (see ROR α -immunolabelling procedures below), C_0 is the total number of target cells and V is the volume of the viral stock used. Titers from different virus productions averaged 1.7×10^9 transducing units/mL.

Immunocytochemistry

Cells were directly fixed using 4% paraformaldehyde (Sigma) and incubated with primary antibodies (anti-hROR α 1, 1/500, sc-6062, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA and/or anti-Microtubule Associated Protein 2 (MAP2), 1/500, clone HM-2, Sigma), followed by either FITC- or Cy3-conjugated secondary antibodies (Jackson Immunoresearch, Interchim, Montluçon, France).

Quantitative and non-quantitative RT-PCR

Total RNA from neurones was prepared according to the manufacturer's instructions using the RNeasy kit (Qiagen, Valencia, CA,

USA) and cDNAs were synthesized from 1 μg of RNA (Promega, Madison, WI, USA) and AMV reverse transcriptase, as per manufacturer's instructions.

Non-quantitative PCR

The resulting cDNAs were used as templates in a solution containing Qiagen PCR Buffer 1X, 0.2 μM of each primer (Table 1), 0.2 μM dNTP and 1.5 units Taq DNA Polymerase (PCR Core Kit, Qiagen). The reaction was performed over 30 cycles as follows: 94°C for 45 s; 59°C for mouse ROR α 1 or 60°C for hROR α 1 and Hypoxanthyl Phosphorybosyl Transferase (HPRT) for 1 min; 72°C for 2 min followed by 7 min at 72°C .

Real time PCR

RT-PCR was performed using the qPCR core kit for SYBR Green I-No ROX (Eurogentec). Reactions were performed in a 25 μL total volume containing SYBR Green PCR core reagents with 8 ng of the first-strand cDNA and 300 nM of primers (see Table 1). Amplification was performed on an iCycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) according to the manufacturer's instructions and cycle parameters were: 50°C (2 min) and 95°C (10 min), followed by 40 cycles of 95°C (15 s), 60°C (30 s) and 72°C (30 s). For expression quantification, a comparative C_T method was used (Aarskog and Vedeler 2000; Pfaffl 2001). The ΔC_T value was obtained by subtracting the C_T value of the 18S (reference) from the C_T value of the gene of interest where, in each case, the mean value of three reactions was used. For each gene, the fold change was calculated according to the formula $2^{-(\Delta\Delta C_T)}$, where $\Delta\Delta C_T$ was the difference between the ΔC_T in Lenti-hROR α 1-infected cultures and the ΔC_T in Lenti-GFP-infected cultures as a calibrator value. To distinguish specific amplicons from non-specific amplifications, a dissociation curve was generated for each transcript. Quantification was performed on three independent experiments.

β -amyloid peptide (25–35), c_2 -ceramide and H_2O_2 treatment

Cortical neurones were treated with A β (25–35) (60 μM), c_2 -ceramide (40 μM) or H_2O_2 (100 μM) for 24 h, as described previously (Brugg *et al.* 1996). The specificity of c_2 -ceramide was evaluated by comparing its effects with those of the c_2 -dihydro-

Table 1 Primer sequences used in PCR

Gene/Symbol	Gene name	Primers
<i>mRORα</i>	mouse ROR α	F, 5'-AGGCAGAGCTATGCGAGC-3' R, 5'-TCAAACAGTTCTTCTGACGAGG-3'
<i>hRORα1</i>	human ROR α	F, 5'-AAACATGGAGTCAGCTCCG-3' R, 5'-CATAACAAGCTGTCTCTCTGC-3'
<i>HPRT</i>	HPRT	F, 5'-CCTGCTGGATTACATTAAGCACTG-3' R, 5'-GTCAAGGGCATATCCAACAACAAAC-3'
<i>Sod1</i>	Superoxide dismutase 1	F, 5'-TGGGTTCCACGTCCATCAGT A-3' R, 5'-ACCGTCCTTTCCAGCAGTCA-3'
<i>Gpx1</i>	Glutathione peroxidase 1	F, 5'-GGGACTACACCGAGATGAACGA-3' R, 5'-ACCATTCACTTCGCACTTCTCA-3'
<i>Cat</i>	Catalase	F, 5'-GCGTCCAGTGCGCTGTAGA-3' R, 5'-TCAGGGTGGACGTCAGTGAA-3'
<i>Prx6</i>	Peroxiredoxin VI	F, 5'-TTGATGATAAGGGCAGGGAC-3' R, 5'-CTACCATCAGCTCTCTCCC-3'
<i>18s</i>	18s rRNA	F, 5'-GGGAGCCTGAGAAACGGC-3' R, 5'-GGGTCCGAGTGGGTAATTT-3'

ceramide analogue (Biomol Research Laboratory), unable to activate the sphingomyelin pathway in lymphocytes (Obeid *et al.* 1993) and neurones (Brugg *et al.* 1996). Specificity of A β (25–35) has been evaluated with a scrambled peptide in several studies (Korotzer *et al.* 1993; Loo *et al.* 1993; Giovannelli *et al.* 1995; Meda *et al.* 1996; Dore *et al.* 1997).

Cell viability

The survival rate in transduced neurones was assessed by flow cytometry analyses of 7-amino actinomycin D (Sigma) labelling of apoptotic neurones, as previously described (Lecoeur *et al.* 2002, 2004). 7-Amino actinomycin D emission was detected in the FL-3 channel ($\lambda > 650$ nm, PMT voltage = 333). Neuritic debris was discarded from the analysis as described for cells grown in suspension (Lecoeur *et al.* 1997, 2004).

The survival rate in transfected neurones was assessed by counting the percentage of living neurones after visual assessment of chromatin Hoechst staining among the transfected neuronal population and analysed using IMAGE-PRO PLUS, as previously described (Willaime-Morawek *et al.* 2003). Immunofluorescence images were captured at 400 \times magnification using a Qimaging Retiga 1300 camera VayTek, Fairfield, IA, USA. Images of 20 independent fields per experiment ($n = 3$ for each treatment) were taken, corresponding to approximately 200 transfected neurones for the controls.

Measurement of reactive oxygen species

In transfection-mediated hROR α 1 overexpression experiments, neurones were cotransfected with pDsRed2 and either pSG5 or pSG5-hROR α 1, loaded at 7 days *in vitro* with 15 μ M CM-H₂DCFDA (ROS probe) for 30 min at 37°C, washed twice and then treated to induce apoptosis as described. Analyses were performed after 1 h for H₂O₂, 4 h for A β (25–35) or 6 h for c₂-ceramide treatment. These times correspond to the peak of ROS probe green fluorescence for each treatment (data not shown). Images from fluorescence were captured on living cells taking parallel images with DsRed2 fluorescence, from 20 independent fields, corresponding to approximately 200 DsRed2-positive neurones, for each experiment ($n = 4$ for each treatment). The percentage of double-positive red and green fluorescent neurones was calculated after analysis with IMAGE-PRO PLUS 4.1 software.

In lentiviral transduction-mediated hROR α 1 overexpression experiments, ROS probe green fluorescence emission of CM-H₂DCFDA-loaded neurones was analysed by flow cytometry analyses. Green fluorescence was detected in the FL-1 channel and the mean fluorescence intensity in the population was determined for each sample. Neuritic debris was discarded from the analyses as described in the cell viability section.

Fluorescence analyses

Fluorescence microscopy was performed with an inverted microscope (Nikon Eclipse TE 300, Champigny sur Marne, France). Immunofluorescence images were captured at 400 \times magnification using a Qimaging Retiga 1300 camera and analysed using IMAGE-PRO PLUS 4.1 software (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). Flow cytometry analyses were performed on a FACSCalibur cytometer (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), equipped with a single 488-nm argon laser. For each sample, 100 000 events were recorded in list mode and registered on logarithmic scales. Analysis was performed with the WINMDI 2.8 software.

Results

Neuronal human retinoic acid receptor-related orphan receptor α 1 overexpression

In order to overexpress ROR α in cortical neurones, two different methods of gene transfer were used: (i) cell transduction by infection with a recombinant non-replicative lentiviral-derived vector encoding either hROR α 1 (Lenti-hROR α 1) or GFP (control, Lenti-GFP) under the control of the phosphoglycerate kinase promoter and (ii) transient cell transfection with a plasmid encoding hROR α 1 under the control of SV40 promoter. In transfection experiments, primary cortical neurones were cotransfected after 4 days in culture with pDsRed2 (red fluorescent protein) and either pSG5 (control neurones) or pSG5-hROR α 1. Specific primers for endogenous mouse ROR α 1 isoform and exogenous hROR α 1 were used to perform RT-PCR on control and pSG5-hROR α 1-transfected cultures. Both cultures were found to express the endogenous mouse ROR α 1 isoform (Fig. 1a). This is the first demonstration

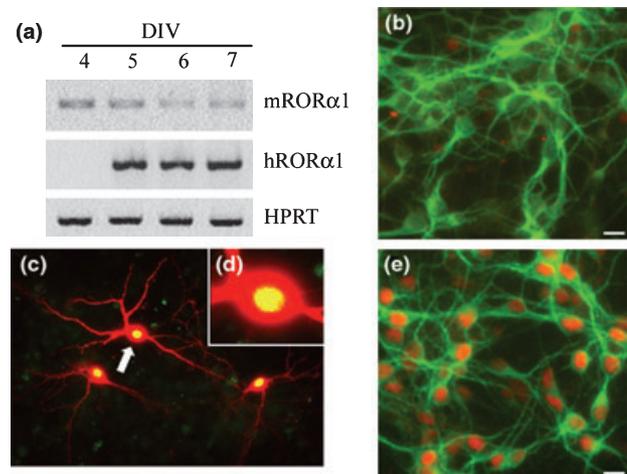


Fig. 1 Retinoic acid receptor-related orphan receptor α (ROR α) overexpression in cultured cortical neurones. Neurones at 4 days *in vitro* (DIV) were cotransfected with pSG5-hROR α 1 and pDsRed2 (a, c and d) or neurones were infected before plating at 0 DIV with Lenti-hROR α 1 (e), as per experimental procedures. (a) Specific murine ROR α 1 (mROR α 1), human ROR α 1 (hROR α 1) and Hypoxanthyl Phosphorybosyl Transferase (HPRT) RT-PCR products are visualized following electrophoresis in the presence of ethidium bromide after 1 (5 DIV), 2 (6 DIV) and 3 (7 DIV) days post-transfection. The HPRT housekeeping gene was used as a positive control of the RT-PCR reaction. (b) Control neurones (neither transfected nor infected) visualized with dendritic-specific MAP2 immunolabelling (green) lacking ROR α labelling. (c) Transfected neurones express both DsRed2 (red) and ROR α (green) proteins which produce a yellow colour when merged (arrow). (d) Enlargement of the cell indicated in (c). (e) Lenti-hROR α 1-infected neurones with ROR α (red) and Microtubule Associated Protein 2 (MAP2) (green) double immunolabelling. Scale bar, 20 μ m.

that embryonic cortical neurones endogenously express *Rora*. As expected, 24 h after transfection, exogenous expression of hROR α 1 isoform was detected only in the pSG5-hROR α 1-transfected cultures and not in those transfected with pSG5 (Fig. 1a).

Retinoic acid receptor-related orphan receptor α *in situ* immunofluorescent labelling was assessed with a polyclonal antibody raised against a fragment in the C-terminal of the ROR α protein; the antibody should thus recognize all isoforms of both human and mouse ROR α . However, in the control neurones (Fig. 1b), the absence of labelling was probably due to the low level of endogenous *Rora* expression. Therefore, the identification of exogenous hROR α 1-expressing neurones in cultures cotransfected by pDsRed2 and pSG5-hROR α 1 was greatly facilitated. Using the ROR α antibody, specific labelling was confined to the nucleus (Figs 1c–e). Consistent with the method of transfection (pSG5 or pSG5-hROR α 1 were cotransfected with pDsRed2 at a 5 : 1 w/w ratio), approximately 90% of pDsRed2-expressing neurones were positive for ROR α immunolabelling (data not shown). Thus, in cultures cotransfected with pSG5-hROR α 1 and pDsRed2, neurones expressing DsRed2 were likewise considered to be expressing hROR α 1. In infected cultures, ROR α immunolabelling revealed that most of the neurones in culture were positive for ROR α (Fig. 1e; as well as GFP expression for Lenti-GFP-infected neurones, data not shown). The transduction efficiency by our lentiviral vectors was determined and reached 96%.

Human retinoic acid receptor-related orphan receptor α 1 overexpression provides neuroprotection against β -amyloid peptide (25–35)-, c_2 -ceramide- and H_2O_2 -induced apoptosis

The cerebellar phenotype of ROR α loss-of-function mutation mice suggests that ROR α may play a neuroprotective role. In order to test this hypothesis, we measured the survival rate of hROR α 1-overexpressing neurones exposed to pro-apoptotic stimuli. At 5 days after lentiviral infection with Lenti-hROR α 1 or Lenti-GFP for the controls, neurones were exposed to A β (25–35) (60 μ M), c_2 -ceramide (40 μ M) or H_2O_2 (100 μ M) for 24 h. In the control neurones after pro-apoptotic treatments, chromatin condensation, nuclear fragmentation and caspase 3 activation were observed (data not shown). Although apoptosis was induced in all conditions [illustrated in Figs 2a–d for A β (25–35) treatment], comparing the hROR α 1-overexpressing (Figs 2b and d) versus control (Figs 2a–c) neurones demonstrated that the survival rate was increased for those neurones expressing hROR α 1. Apoptotic neurones were quantified by flow cytometer analyses using 7-amino actinomycin D labelling (Fig. 2e). The survival rate significantly increased up to 59, 44 and 56% after 24 h of A β (25–35), c_2 -ceramide and H_2O_2 treatment, respectively (Fig. 2e). Our results reveal that neurones overexpressing hROR α 1 were less susceptible to a variety of apoptotic stimuli.

Decrease of reactive oxygen species content in human retinoic acid receptor-related orphan receptor α 1-overexpressing neurones

β -amyloid peptide (25–35), c_2 -ceramide and H_2O_2 are known to induce apoptosis in part by an increase in the cellular ROS content, leading to an oxidative stress. Indeed, a critical ROS production has been highlighted in apoptosis induced by A β (25–35), c_2 -ceramide and H_2O_2 (Behl *et al.* 1994; Quillet-Mary *et al.* 1997). ROS accumulation is deleterious for cellular functions due to protein oxidation and lipid peroxidation. We have thus measured the neuronal ROS production in our experimental conditions, as observed by the green fluorescence emission in living neurones loaded with the CM- H_2 DCFDA ROS probe (Figs 3a and d). For optimal green fluorescence emission, ROS probe fluorescence acquisition is preferentially performed on living non-fixed cells. For bio-safety reasons, lentiviral-infected neurones must be fixed in order to inactivate HIV-derived lentiviral particles prior to any analyses. Thus, ROS production was analysed in both living neurones that overexpress hROR α 1 by transient transfection and in fixed Lenti-hROR α 1-transduced neurones. We demonstrated that hROR α 1 overexpression by transient transfection leads to a neuroprotection in transfected neurones. Counting the transfected living neurones by Hoechst nuclear staining after pro-apoptotic treatment showed an increased survival rate in pSG5-hROR α 1-compared with pSG5-transfected cultures to the same extent as that observed with Lenti-hROR α 1- and Lenti-GFP-infected neurones (Fig. 2f). This allowed us to use this method to measure the ROS production in living transfection-mediated hROR α 1-overexpressing neurones. After cotransfection of pDsRed2 with either pSG5 (Fig. 3b) or pSG5-hROR α 1 (Fig. 3e), followed by A β (25–35) (Figs 3c and f), c_2 -ceramide or H_2O_2 treatment, we measured the percentage of neurones that produced ROS after 1, 4 or 6 h of treatment, respectively. We observed a significant decrease of ROS-stained neurones among the population of hROR α 1-overexpressing neurones compared with the control by 43, 30 and 48% for pSG5-hROR α 1-transfected neurones after A β (25–35), c_2 -ceramide and H_2O_2 treatment, respectively (Fig. 3g). In addition, we performed a ROS production analysis in Lenti-hROR α 1-transduced neurones by acquiring the ROS probe fluorescence intensity by fluorescence-activated cell sorting analyses on fixed neurones. This method allowed us to quantify different intensities of green fluorescent ROS-staining neurones; we observed a significant decrease in the mean intensity of fluorescence in Lenti-hROR α 1 neurones compared with the control by 49, 31 and 50% after A β (25–35), c_2 -ceramide and H_2O_2 treatment, respectively (Fig. 3h).

Overexpression of hROR α 1 in neurones thus leads to a decreased content of cellular ROS.

Increased *Gpx1* and *Prx6* mRNA levels in hROR α 1-overexpressing neurones

Antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (which reduces O_2^- to H_2O_2), catalase and peroxidases (which reduce H_2O_2 to H_2O) participate in cell protection against the potentially damaging effects of ROS. Microarray analyses in *Drosophila* have shown that Drosophila Hormone 3 (DHR3), the *Drosophila* homologue of ROR α , up-regulates the expression of a factor related to the mammalian antioxidant protein-2 [also named peroxiredoxin (Prx) 6 or 1-Cys Prx] (White *et al.* 1999), suggesting that the transcription factor ROR α could regulate the expression of antioxidant proteins. To determine whether the decrease of ROS content in hROR α 1-overexpressing neurones is the consequence of an increased antioxidant activity in neurones, we analysed, by real time RT-PCR, the expression of the antioxidant enzymes catalase, SOD1, glutathione peroxidase (Gpx) 1 and Prx6 in lentiviral vector-transduced neuronal cultures. Our results revealed a 2.5- and 2.7-fold increased expression of *Gpx1* and *Prx6*, respectively, in Lenti-hROR α 1-infected cultures compared with control, whereas expression of *Cat* and *Sod1* remained unaltered in these cultures (Fig. 4).

Significance of *Gpx1* and *Prx6* expression in the neuroprotective effect of retinoic acid receptor-related orphan receptor α

In order to determine whether the increased expression of *Gpx1* and *Prx6* in hROR α 1-overexpressing neurones is

responsible for the ROR α -mediated neuroprotection observed, we blocked both *Gpx1* and *Prx6* expression in knocking-down experiments by si-RNA transfection in

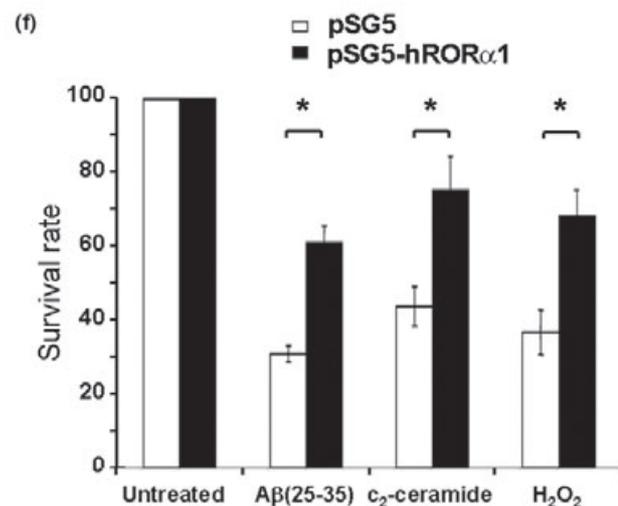
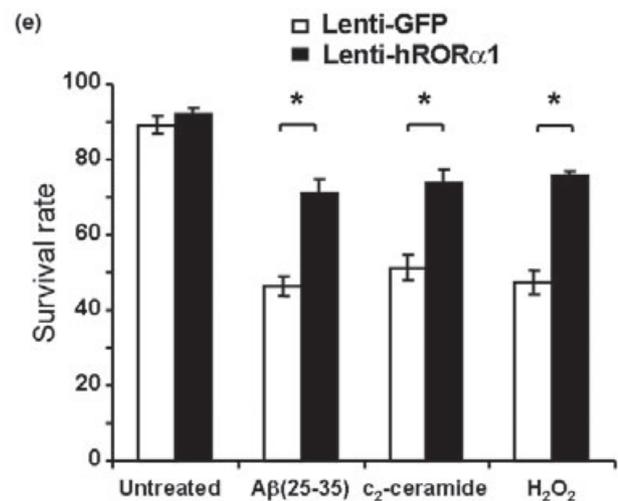
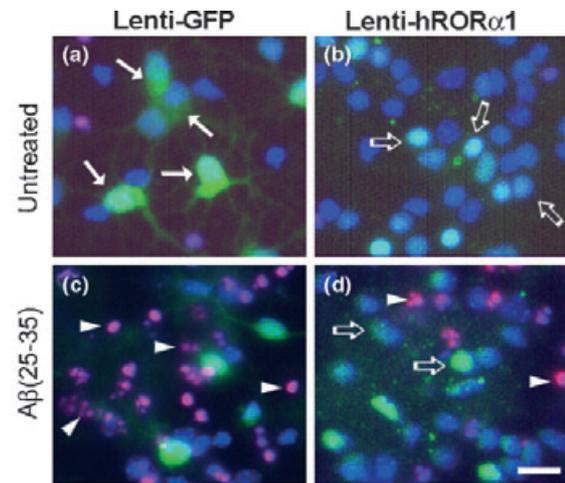


Fig. 2 Survival of cultured cortical neurones overexpressing human retinoic acid receptor-related orphan receptor α 1 (hROR α 1) after β -amyloid peptide (A β)(25–35), c₂-ceramide or H₂O₂ treatment. (a–e) Neurones were infected with Lenti-GFP (control) or Lenti-hROR α 1 and then exposed for 24 h to A β (25–35) (60 μ M), c₂-ceramide (40 μ M) or H₂O₂ (100 μ M). Neurones were infected with either Lenti-GFP (a and c) or Lenti-hROR α 1 (b and d). Green Fluorescent Protein (GFP) is detected by green fluorescence expression (white arrow) and retinoic acid receptor-related orphan receptor α (ROR α) expression is detected by green ROR α immunolabelling (empty arrow). (a and b) Untreated neurones and (c and d) neurones exposed to A β (25–35) for 24 h at 60 μ M. Whereas Hoechst 33342 (blue) stains chromatin of all cells (both living and apoptotic), dying or dead neurones in which the nuclear envelope becomes permeable may be stained red with 7-amino actinomycin D (7-AAD) (arrowheads). Scale bar, 20 μ m. (e) Survival rate is determined by flow cytometry using 7-AAD as specific labelling of apoptotic neurones. The data presented are the mean \pm SEM of three independent experiments ($n = 3$). (f) Neurones were cotransfected with pDsRed2 and either pSG5 (control, \square) or pSG5-hROR α 1 (\blacksquare) and then exposed for 24 h to the pro-apoptotic treatments. Intact nuclei were identified by Hoechst staining of chromatin and counted among the transfected neuronal population as visualized by DsRed2 expression. The data presented are the mean \pm SEM of three independent experiments ($n = 3$). Statistical significance of survival between control neurones and hROR α 1-overexpressing neurones was determined by the χ^2 test where $*p < 0.0001$.

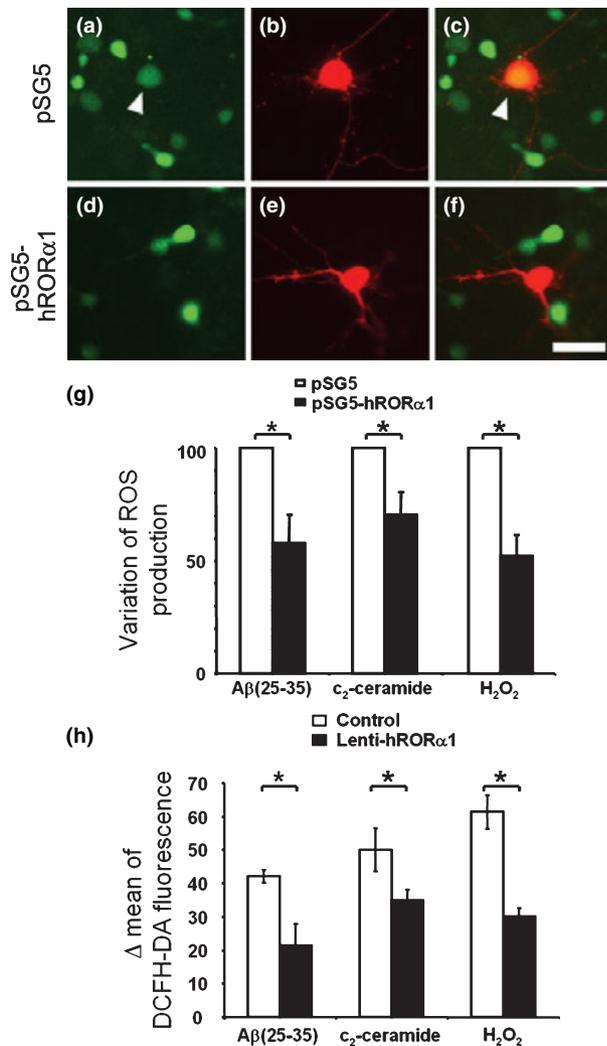


Fig. 3 Reactive oxygen species (ROS) detection in cultured cortical neurons overexpressing human retinoic acid receptor-related orphan receptor α 1 (hROR α 1) after induction of apoptosis. (a–f) Neurons were cotransfected with pDs-Red2 and either pSG5 (a–c) or pSG5-hROR α 1 (d–f) and then loaded with the ROS probe 5-(and -6) chloromethyl-2',7'-dichlorohydroxymethylfluorescein diacetate, acetyl-ester (CM-H₂DCFDA). Production of ROS was monitored by detection of ROS probe green fluorescence (a and d) among the pDs-Red2-transfected neurons (b and e). Increased ROS levels are observed after treatment with β -amyloid peptide (A β)(25–35) (60 μ M) for 4 h (a–f). (c and f) A merge for the two markers. Transfected cells that produce ROS, as indicated by arrowheads, were counted and data reported in (g). (g) Data are expressed as the variation of ROS production among hROR α 1-overexpressing or control neurons after each of the treatments: A β (25–35) (60 μ M), c₂-ceramide (40 μ M) or H₂O₂ (100 μ M) (mean \pm SEM, $n = 3$). (h) ROS-related DCFHDA green fluorescence in lentiviral-mediated hROR α 1-overexpressing neurons and control neurons. Data are expressed as the difference of mean (Δ mean) fluorescence intensity between untreated neurons and either A β (25–35)-, c₂-ceramide- or H₂O₂-treated neurons. Statistical significance of ROS production between control neurons and hROR α 1-overexpressing neurons was determined by a χ^2 test (* $p < 0.001$). Scale bar, 20 μ m.

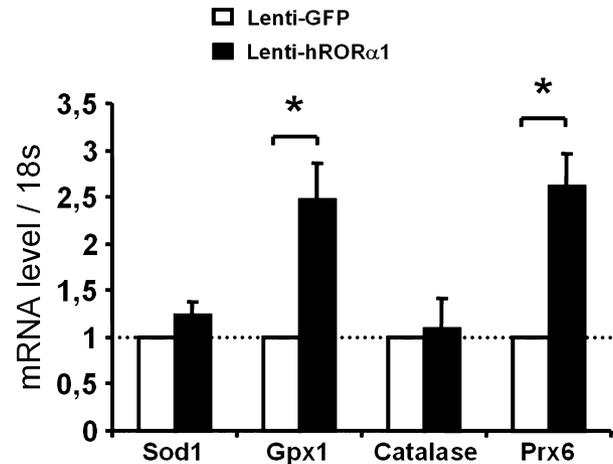


Fig. 4 mRNA levels of superoxide dismutase (SOD) 1, glutathione peroxidase (Gpx) 1, catalase and peroxiredoxin (Prx) 6 in cortical neurons overexpressing human retinoic acid receptor-related orphan receptor α 1 (hROR α 1). Neurons were infected with Lenti-GFP (control) or Lenti-hROR α 1. Levels of mRNA were determined by real time RT-PCR and standardized to 18s rRNA. The data presented are shown as the mRNA fold change \pm SE from the level in control neurons, obtained from three independent experiments ($n = 3$). Statistical significance was determined by a Student's t -test (* $p < 0.05$).

Lenti-hROR α 1-infected neurons. We have designed *Gpx1* mRNA-targeted si-RNAs (si-Gpx1) and *Prx6* mRNA-targeted si-RNAs (si-Prx6). Among the si-RNAs tested, we chose both efficient (si-Gpx1-1 and si-Prx6-1) and inefficient (as control) si-RNAs (si-Gpx1-2 and si-Prx6-2). Both efficient si-Gpx1 and si-Prx6 used in these experiments led to a significant specific decrease of the cellular expression of the corresponding target gene, 75% for si-Gpx1 and 71% for si-Prx6 in both Lenti-hROR α 1- and Lenti-GFP-infected cultures (Figs 5a and b). By contrast, the inefficient si-RNAs that we chose were unable to knock-down the expression of both genes tested (Figs 5a and b). These inefficient si-Gpx1-2 and si-Prx6-2 si-RNAs were used as controls for the si-RNA experiments. We first tested the survival of neurons with a decreased expression of *Gpx1* and *Prx6* and observed a slight but significant decrease of the survival rate in the absence of any apoptotic treatment in both si-Gpx1-1- and si-Prx6-1-transfected cultures compared with, respectively, si-Gpx1-2- and si-Prx6-2 control-transfected cultures (Figs 5c and d), indicating a role for these proteins in neuronal survival. When *Gpx1* and *Prx6* were knocked down, hROR α 1 lost its protective effect against apoptosis (Figs 5c and d). The survival rate of hROR α 1-overexpressing neurons was significantly decreased in si-Gpx1-1-transfected cultures compared with the control si-Gpx1-2-transfected cultures (Fig. 5c). A similar decrease in survival was observed in hROR α 1-overexpressing neurons transfected by si-Prx6-1 compared with si-Prx6-2 controls (Fig. 5d). The hROR α 1-mediated neuroprotection was

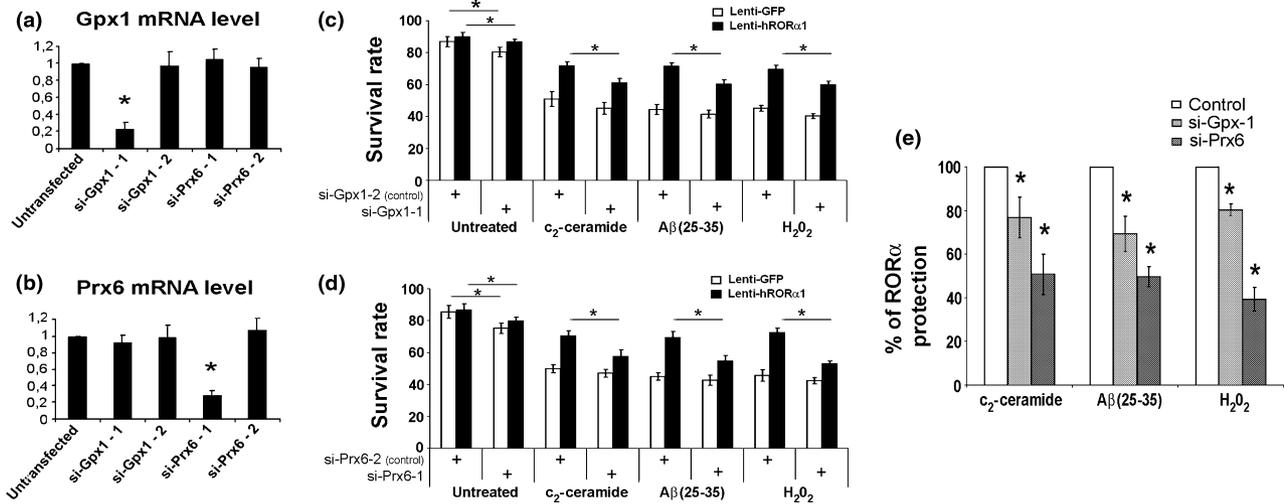


Fig. 5 Human retinoic acid receptor-related orphan receptor α 1 (hROR α 1)-mediated neuroprotection after glutathione peroxidase (Gpx) 1 and peroxiredoxin (Prx) 6 down-regulation with specific small interfering RNA (si-RNA). (a and b) Neurons were transfected with Gpx1 or Prx6 mRNA-targeted si-RNA and levels of Gpx1 (a) and Prx6 (b) mRNA were determined by real time RT-PCR and standardized to 18S rRNA. The data presented are shown as the mRNA fold change \pm SE from the level in untransfected neurons, obtained from three independent experiments ($n = 3$). Statistical significance from untransfected neurons was determined by a Student's t -test ($*p < 0.05$). (c and d) Neurons were infected with Lenti-GFP (control, \square) or Lenti-hROR α 1 (\blacksquare). Survival rate is determined by flow cytometry using 7-amino actinomycin D in neurons transfected with Gpx1 (c) or Prx6 (d)

mRNA-targeted si-RNA and then exposed for 24 h to β -amyloid peptide (A β)(25–35) (60 μ M), c_2 -ceramide (40 μ M) or H_2O_2 (100 μ M). The data presented are the mean \pm SEM of three independent experiments ($n = 3$). Statistical significance was determined by a Student's t -test ($p < 0.0001$). *Statistical significance relative to control (si-Gpx1-2 or si-Prx6-2) Lenti-hROR α 1, respectively. (e) The data presented are the mean \pm SEM of the percentage of hROR α 1-mediated neuroprotection observed in neurons; protection due to hROR α 1 in respective control (transfected with the inefficient si-Gpx1-2 or si-Prx6-2 si-RNAs) is considered as 100%. Statistical significance of protection was determined by a χ^2 test ($*p < 0.05$). *Statistical significance relative to controls.

decreased by 24, 31 and 20% in si-Gpx1-1-transfected cultures and 50, 51 and 41% in si-Prx6-1-transfected cultures after c_2 -ceramide, A β (25–35) or H_2O_2 treatment, respectively (Fig. 5e). These results strongly implicate *Gpx1* and *Prx6* at least in part in the neuroprotective effect of ROR α .

Discussion

Oxidative stress plays a crucial role in a wide variety of pathologies including stroke, ischaemia reperfusion injuries and general cardiovascular traumas as well as in age-associated neurodegenerative processes, physiological conditions (normal ageing) or pathological conditions such as Parkinson's and Alzheimer's disease. ROS are highly reactive reduced metabolites of O_2 that are produced in particular during electron transfer reactions in mitochondria. Excessive ROS production by mitochondria has been shown to cause damage to lipids, proteins and DNA (Freeman and Crapo 1982; Thannickal and Fanburg 2000) and to activate the JNK/c-Jun pathway, leading to the induction of apoptosis (Verheij *et al.* 1996; Morishima *et al.* 2001). In accordance with previous studies, we found that primary cortical neurons exposed to different apoptotic stimuli, such as A β (25–35), c_2 -ceramide and H_2O_2 , underwent apoptotic cell

death, characterized by an early production of ROS, neurite fragmentation and retraction, caspase 3 activation, chromatin condensation and fragmentation (Loo *et al.* 1993; Behl *et al.* 1994; Whitemore *et al.* 1994; Brugg *et al.* 1996; Quillet-Mary *et al.* 1997). Several *in vitro* studies revealed that mitochondrial ROS production is an early and crucial step in the apoptogenic signalling cascade that may be blocked by ROS scavengers (Annunziato *et al.* 2003).

Our study demonstrates for the first time that overexpression of the gene encoding the nuclear receptor ROR α in cortical neurons decreases this early ROS production, and that these neurons are less sensitive to apoptotic stimuli as compared with the controls. The decrease in ROS production and the subsequent neuroprotection observed are specific to the overexpression of the hROR α 1 isoform; overexpression of the isoform hROR α 4, an alternative splice variant with the same DNA binding domain but a modified N-terminal modulator domain, led neither to ROS decrease nor to neuroprotection (data not shown). This result indicates that the effects observed are not driven by the protein overexpression *per se* but actually result from the specific function of the hROR α 1 protein. Our experiments clearly demonstrate that hROR α 1 overexpression in cortical neurons reduces ROS accumulation (Fig. 3) after both A β (25–35) and

c₂-ceramide as well as after H₂O₂ treatment. From our results, we conclude that ROR α exerts its antioxidant actions through an increased expression of genes involved in the clearance of ROS. One objective of this study was to identify genes that are differentially expressed in hROR α 1-overexpressing neurones and are implicated in the regulation of ROS. By a gene candidate approach, our analysis using real time RT-PCR in hROR α 1-overexpressing cultures revealed an increased expression of *Gpx1* and *Prx6*, two important enzymes in ROS clearance. The *Gpx1* gene encodes the enzyme predominantly responsible for peroxide detoxification in mammalian cells, via its H₂O₂-degrading capacity. Its overexpression by viral vector infection has been shown to protect from cell death induced by experimental stroke *in vivo* (Hoehn *et al.* 2003). Furthermore, primary cortical cultures overexpressing *Gpx1* were shown to be more resistant to A β -induced neurotoxicity (Barkats *et al.* 2000). Prxs are peroxidases that reduce H₂O₂ to water via the use of electrons provided by a physiological thiol like thioredoxin (Rhee *et al.* 2005). Unlike the other members of the Prx family, Prx6, also termed antioxidant protein-2 or 1-Cys Prx, is a bifunctional enzyme with both Gpx and phospholipase A₂ activities (Chen *et al.* 2000). Prx6 plays an important role in cellular defence against oxidative stress; its overexpression leads to an increased survival in fibroblasts (Dierick *et al.* 2003; Salmon *et al.* 2004) and in lung cell lines (Manevich *et al.* 2002; Pak *et al.* 2002). By contrast, superoxide dismutase 1 (or Cu/Zn superoxide dismutase), known to be neuroprotective against ROS-related toxicity such as ischaemia (Sugawara *et al.* 2002), glutamate toxicity (Barkats *et al.* 1996) or 6-hydroxydopamine toxicity (Barkats *et al.* 2002), does not seem to be up-regulated by overexpression of hROR α 1 in cultured cortical neurones. Our results thus indicate that ROR α overexpression leads to an increased expression of a subset of genes implicated in ROS clearance. We demonstrate that both *Gpx1* and *Prx6* proteins can mediate neuroprotection. Down-regulation of *Gpx1* or *Prx6* by si-RNA leads to a decrease of the neuroprotection brought by the overexpression of hROR α 1. Nevertheless, hROR α 1 continues to induce some neuroprotection despite inhibition of both *Gpx1* and *Prx6*, thus indicating that other as yet unknown proteins participate in this neuroprotection.

Retinoic acid receptor-related orphan receptor α has also been implicated in many phenotypes other than cerebellar atrophy, in particular in osteogenic (Meyer *et al.* 2000) and myogenic (Lau *et al.* 1999) differentiation, in vascular biology (for review, see Boukhtouche *et al.* 2004) and in ageing processes including chronic inflammatory diseases such as susceptibility to osteoporosis (Meyer *et al.* 2000) and atherosclerosis (Mamontova *et al.* 1998). In *staggerer*, susceptibility to atherosclerosis has been related at least partially to a profound hypoalphalipoproteinaemia that is associated with decreased plasma levels of high density lipoproteins (Vu-Dac *et al.* 1997). Moreover, abnormalities in immuno-inflamma-

tory responses have also been described in Rora^{sg/sg} mice (Kopmels *et al.* 1992; Vernet-der Garabedian *et al.* 1998) and ROR α has been shown to be a negative regulator of the inflammatory response (Delerive *et al.* 2001). As excessive ROS production and inflammation have been implicated in the pathogenesis of atherosclerosis (Kunsch and Medford 1999; Ludewig *et al.* 2002), an abnormal ROS regulation in the *staggerer* mutant may thus contribute to the occurrence of such chronic inflammatory pathologies.

Although the mechanisms underlying the *staggerer* cerebellar degeneration remain unclear, we may now hypothesize that ROR α 's control of cellular oxidative damage, such as that induced by trophic deprivation (Satoh *et al.* 1996), renders it essential for Purkinje cell survival. Microarray analyses of *staggerer* developing cerebellum have recently shown an overexpression of several genes implicated in the calcium second messenger signalling and in calcium buffering (Gold *et al.* 2003). A concomitant ROS-mediated elevation of intracellular calcium has been associated with the loss of intracellular calcium homeostasis and the pathogenesis of many neurodegenerative diseases (France-Lanord *et al.* 1997; Annunziato *et al.* 2003; Rego and Oliveira 2003). Heterozygous *staggerer* mutants, in which a 'half-dose' of functional ROR α protein is translated, display a precocious loss of Purkinje cells during ageing (Zanjani *et al.* 1992; Doulazmi *et al.* 2002). This increased Purkinje cell loss could be linked to the loss of the antioxidant actions of ROR α , whereas in wild type the activity of ROR α might temper oxidative stress thus leading to a relative neuroprotection during ageing compared with that observed in the heterozygous *staggerer* mutant. This neuroprotection displayed by overexpression of ROR α and the age-related Purkinje cell loss observed in the *staggerer* heterozygote are of particular interest in the study of neurodegenerative diseases where ROS-induced neuronal death has been implicated. The regulation of expression of the genes encoding *Gpx1* and *Prx6* may explain how ROR α regulates ROS levels, although further experiments will be needed to determine the exact mechanism by which ROR α overexpression leads to an increased expression of these two genes. The discovery that ROR α has an antioxidant action provides a novel insight into the physiological role of ROR α and its ability to reduce oxidative stress during neuronal insults. In this way, ROR α represents a new factor of interest in the regulation of cell survival and, in general, ageing processes throughout the organism.

Acknowledgements

We thank Dr Florence Frederic for her help with statistical analyses and Vanessa Gautheron for her support with cortical cultures. We also thank Dr Hervé Lecoœur from Theraptosis for his technical help with cytometer flow analyses. This research was supported by grants from the French Fondation pour la Recherche Médicale (to FB),

Fondation Lejeune (to FB), GIS Institut de la longévité (to BB/Jean Mariani), NIH NS34309 (to Jean Mariani) and a Marie Curie Fellowship QLGA-CT2001-51075 (European Union) (to CIJ).

References

- Aarskog N. K. and Vedeler C. A. (2000) Real-time quantitative polymerase chain reaction. A new method that detects both the peripheral myelin protein 22 duplication in Charcot-Marie-Tooth type 1A disease and the peripheral myelin protein 22 deletion in hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. *Hum. Genet.* **107**, 494–498.
- Annunziato L., Amoroso S., Pannaccione A., Cataldi M., Pignataro G., D'Alessio A., Sirabella R., Secondo A., Sibaud L. and Di Renzo G. F. (2003) Apoptosis induced in neuronal cells by oxidative stress: role played by caspases and intracellular calcium ions. *Toxicol. Lett.* **139**, 125–133.
- Atkins G. B., Hu X., Guenther M. G., Rachez C., Freedman L. P. and Lazar M. A. (1999) Coactivators for the orphan nuclear receptor ROR α . *Mol. Endocrinol.* **13**, 1550–1557.
- Barkats M., Bemelmans A. P., Geoffroy M. C., Robert J. J., Loquet I., Horellou P., Revah F. and Mallet J. (1996) An adenovirus encoding CuZnSOD protects cultured striatal neurones against glutamate toxicity. *Neuroreport* **7**, 497–501.
- Barkats M., Millecamps S., Abrioux P., Geoffroy M. C. and Mallet J. (2000) Overexpression of glutathione peroxidase increases the resistance of neuronal cells to Abeta-mediated neurotoxicity. *J. Neurochem.* **75**, 1438–1446.
- Barkats M., Millecamps S., Bilang-Bleuel A. and Mallet J. (2002) Neuronal transfer of the human Cu/Zn superoxide dismutase gene increases the resistance of dopaminergic neurons to 6-hydroxydopamine. *J. Neurochem.* **82**, 101–109.
- Behl C., Davis J. B., Lesley R. and Schubert D. (1994) Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity. *Cell* **77**, 817–827.
- Bitsch F., Aichholz R., Kallen J., Geisse S., Fournier B. and Schlaeppli J. M. (2003) Identification of natural ligands of retinoic acid receptor-related orphan receptor alpha ligand-binding domain expressed in Sf9 cells – a mass spectrometry approach. *Anal. Biochem.* **323**, 139–149.
- Boukhtouche F., Mariani J. and Tedgui A. (2004) The 'CholesteROR' protective pathway in the vascular system. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**, 637–643.
- Brugg B., Michel P. P., Agid Y. and Ruberg M. (1996) Ceramide induces apoptosis in cultured mesencephalic neurons. *J. Neurochem.* **66**, 733–739.
- Chen J. W., Dodia C., Feinstein S. I., Jain M. K. and Fisher A. B. (2000) l-Cys peroxiredoxin, a bifunctional enzyme with glutathione peroxidase and phospholipase A2 activities. *J. Biol. Chem.* **275**, 28 421–28 427.
- Delerive P., Monte D., Dubois G., Trottein F., Fruchart-Najib J., Mariani J., Fruchart J. C. and Staels B. (2001) The orphan nuclear receptor ROR alpha is a negative regulator of the inflammatory response. *EMBO Rep.* **2**, 42–48.
- Dierick J. F., Wenders F., Chainiaux F., Remacle J., Fisher A. B. and Toussaint O. (2003) Retrovirally mediated overexpression of peroxiredoxin VI increases the survival of WI-38 human diploid fibroblasts exposed to cytotoxic doses of tert-butylhydroperoxide and UVB. *Biogerontology* **4**, 125–131.
- Dore S., Kar S. and Quirion R. (1997) Insulin-like growth factor I protects and rescues hippocampal neurons against beta-amyloid- and human amylin-induced toxicity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **94**, 4772–4777.
- Doulazmi M., Frederic F., Lemaigre-Dubreuil Y., Hadj-Sahraoui N., Delhaye-Bouchaud N. and Mariani J. (1999) Cerebellar Purkinje cell loss during life span of the heterozygous staggerer mouse (Rora(+)/Rora(sg)) is gender-related. *J. Comp. Neurol.* **411**, 267–273.
- Doulazmi M., Frederic F., Capone F., Becker-Andre M., Delhaye-Bouchaud N. and Mariani J. (2001) A comparative study of Purkinje cells in two ROR α gene mutant mice: staggerer and ROR α ph(-/-). *Brain Res. Dev. Brain Res.* **127**, 165–174.
- Doulazmi M., Hadj-Sahraoui N., Frederic F. and Mariani J. (2002) Diminishing Purkinje cell populations in the cerebella of aging heterozygous Purkinje cell degeneration but not heterozygous nervous mice. *J. Neurogenet.* **16**, 111–123.
- Elbashir S. M., Martinez J., Patkaniowska A., Lendeckel W. and Tuschl T. (2001) Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J.* **20**, 6877–6888.
- Forloni G. (1993) beta-Amyloid neurotoxicity. *Funct. Neurol.* **8**, 211–225.
- Forloni G., Chiesa R., Smiroldo S., Verga L., Salmona M., Tagliavini F. and Angeretti N. (1993) Apoptosis mediated neurotoxicity induced by chronic application of beta amyloid fragment 25–35. *Neuroreport* **4**, 523–526.
- France-Lanord V., Brugg B., Michel P. P., Agid Y. and Ruberg M. (1997) Mitochondrial free radical signal in ceramide-dependent apoptosis: a putative mechanism for neuronal death in Parkinson's disease. *J. Neurochem.* **69**, 1612–1621.
- Freeman B. A. and Crapo J. D. (1982) Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.* **47**, 412–426.
- Giguere V. (1999) Orphan nuclear receptors: from gene to function. *Endocr. Rev.* **20**, 689–725.
- Giovannelli L., Casamenti F., Scali C., Bartolini L. and Pepeu G. (1995) Differential effects of amyloid peptides beta-(1–40) and beta-(25–35) injections into the rat nucleus basalis. *Neuroscience* **66**, 781–792.
- Gold D. A., Baek S. H., Schork N. J., Rose D. W., Larsen D. D., Sachs B. D., Rosenfeld M. G. and Hamilton B. A. (2003) ROR α coordinates reciprocal signaling in cerebellar development through sonic hedgehog and calcium-dependent pathways. *Neuron* **40**, 1119–1131.
- Hadj-Sahraoui N., Frederic F., Zanjani H., Delhaye-Bouchaud N., Herrup K. and Mariani J. (2001) Progressive atrophy of cerebellar Purkinje cell dendrites during aging of the heterozygous staggerer mouse (Rora(+)/sg). *Brain Res. Dev. Brain Res.* **126**, 201–209.
- Hamilton B. A., Frankel W. N., Kerrebrock A. W. et al. (1996) Disruption of the nuclear hormone receptor ROR α in staggerer mice. *Nature* **379**, 736–739.
- Hannun Y. A. (1996) Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. *Science* **274**, 1855–1859.
- Harris J. M., Lau P., Chen S. L. and Muscat G. E. (2002) Characterization of the retinoid orphan-related receptor- α coactivator binding interface: a structural basis for ligand-independent transcription. *Mol. Endocrinol.* **16**, 998–1012.
- Herrup K. (1983) Role of staggerer gene in determining cell number in cerebellar cortex. I. Granule cell death is an indirect consequence of staggerer gene action. *Brain Res.* **313**, 267–274.
- Hoehn B., Yenari M. A., Sapolsky R. M. and Steinberg G. K. (2003) Glutathione peroxidase overexpression inhibits cytochrome C release and proapoptotic mediators to protect neurons from experimental stroke. *Stroke* **34**, 2489–2494.
- Jarvis C. I., Staels B., Brugg B., Lemaigre-Dubreuil Y., Tedgui A. and Mariani J. (2002) Age-related phenotypes in the staggerer mouse expand the ROR α nuclear receptor's role beyond the cerebellum. *Mol. Cell Endocrinol.* **186**, 1–5.
- Kallen J. A., Schlaeppli J. M., Bitsch F., Geisse S., Geiser M., Delhon I. and Fournier B. (2002) X-Ray structure of the hROR α LBD at

- 1.63 A. Structural and functional data that cholesterol or a cholesterol derivative is the natural ligand of ROR α . *Structure (Camb.)* **10**, 1697–1707.
- Kopmels B., Mariani J., Delhaye-Bouchaud N., Audibert F., Fradelizi D. and Wollman E. E. (1992) Evidence for a hyperexcitability state of staggerer mutant mice macrophages. *J. Neurochem.* **58**, 192–199.
- Korotzer A. R., Pike C. J. and Cotman C. W. (1993) beta-Amyloid peptides induce degeneration of cultured rat microglia. *Brain Res.* **624**, 121–125.
- Krichevsky A. M. and Kosik K. S. (2002) RNAi functions in cultured mammalian neurons. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **99**, 11 926–11 929.
- Kunsch C. and Medford R. M. (1999) Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature. *Circ. Res.* **85**, 753–766.
- Lau P., Bailey P., Dowhan D. H. and Muscat G. E. (1999) Exogenous expression of a dominant negative ROR α vector in muscle cells impairs differentiation: ROR α directly interacts with p300 and myoD. *Nucl. Acids Res.* **27**, 411–420.
- Lecoerur H., Ledru E., Prevost M. C. and Gougeon M. L. (1997) Strategies for phenotyping apoptotic peripheral human lymphocytes comparing ISNT, annexin-V and 7-AAD cytofluorometric staining methods. *J. Immunol. Meth.* **209**, 111–123.
- Lecoerur H., de Oliveira-Pinto L. M. and Gougeon M. L. (2002) Multiparametric flow cytometric analysis of biochemical and functional events associated with apoptosis and oncosis using the 7-aminocincomycin D assay. *J. Immunol. Meth.* **265**, 81–96.
- Lecoerur H., Chauvier D., Langonne A., Rebouillat D., Brugg B., Mariani J., Edelman L. and Jacotot E. (2004) Dynamic analysis of apoptosis in primary cortical neurons by fixed- and real-time cytofluorometry. *Apoptosis* **9**, 157–169.
- Loo D. T., Copani A., Pike C. J., Whittemore E. R., Walencewicz A. J. and Cotman C. W. (1993) Apoptosis is induced by beta-amyloid in cultured central nervous system neurons. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **90**, 7951–7955.
- Ludewig B., Zinkernagel R. M. and Hengartner H. (2002) Arterial inflammation and atherosclerosis. *Trends Cardiovasc. Med.* **12**, 154–159.
- Mamontova A., Seguret-Mace S., Esposito B. *et al.* (1998) Severe atherosclerosis and hypoalphalipoproteinemia in the staggerer mouse, a mutant of the nuclear receptor ROR α . *Circulation* **98**, 2738–2743.
- Manevich Y., Sweitzer T., Pak J. H., Feinstein S. I., Muzykantov V. and Fisher A. B. (2002) 1-Cys peroxiredoxin overexpression protects cells against phospholipid peroxidation-mediated membrane damage. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **99**, 11 599–11 604.
- Meda L., Bonaiuto C., Baron P., Otvos L. Jr, Rossi F. and Cassatella M. A. (1996) Priming of monocyte respiratory burst by beta-amyloid fragment (25–35). *Neurosci. Lett.* **219**, 91–94.
- Meyer T., Kneissel M., Mariani J. and Fournier B. (2000) In vitro and in vivo evidence for orphan nuclear receptor ROR α function in bone metabolism. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **97**, 9197–9202.
- Morishima Y., Gotoh Y., Zieg J., Barrett T., Takano H., Flavell R., Davis R. J., Shirasaki Y. and Greenberg M. E. (2001) Beta-amyloid induces neuronal apoptosis via a mechanism that involves the c-Jun N-terminal kinase pathway and the induction of Fas ligand. *J. Neurosci.* **21**, 7551–7560.
- Obeid L. M., Linardic C. M., Karolak L. A. and Hannun Y. A. (1993) Programmed cell death induced by ceramide. *Science* **259**, 1769–1771.
- Pak J. H., Manevich Y., Kim H. S., Feinstein S. I. and Fisher A. B. (2002) An antisense oligonucleotide to 1-cys peroxiredoxin causes lipid peroxidation and apoptosis in lung epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 49 927–49 934.
- Pfaffl M. W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucl. Acids Res.* **29**, 45.
- Quillet-Mary A., Jaffrezou J. P., Mansat V., Bordier C., Naval J. and Laurent G. (1997) Implication of mitochondrial hydrogen peroxide generation in ceramide-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* **272**, 21 388–21 395.
- Rego A. C. and Oliveira C. R. (2003) Mitochondrial dysfunction and reactive oxygen species in excitotoxicity and apoptosis: implications for the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Neurochem. Res.* **28**, 1563–1574.
- Rhee S. G., Chae H. Z. and Kim K. (2005) Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radic. Biol. Med.* **38**, 1543–1552.
- Salmon M., Dedessus Le Moutier J., Wenders F., Chiarizia S., Eliaers F., Rémacle J., Royer V., Pascal T. and Toussaint O. (2004) Role of the PLA(2)-independent peroxiredoxin VI activity in the survival of immortalized fibroblasts exposed to cytotoxic oxidative stress. *FEBS Lett.* **557**, 26–32.
- Satoh T., Sakai N., Enokido Y., Uchiyama Y. and Hatanaka H. (1996) Survival factor-insensitive generation of reactive oxygen species induced by serum deprivation in neuronal cells. *Brain Res.* **733**, 9–14.
- Sidman R. L., Lane P. V. and Dickie M. M. (1962) staggerer, a new mutation in the mouse affecting the cerebellum. *Science* **136**, 610–612.
- Sirven A., Ravet E., Charneau P., Zennou V., Coulombel L., Guetard D., Pflumio F. and Dubart-Kupperschmitt A. (2001) Enhanced transgene expression in cord blood CD34(+)-derived hematopoietic cells, including developing T cells and NOD/SCID mouse repopulating cells, following transduction with modified trip lentiviral vectors. *Mol. Ther.* **3**, 438–448.
- Steinmayr M., Andre E., Conquet F. *et al.* (1998) staggerer phenotype in retinoid-related orphan receptor alpha-deficient mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **95**, 3960–3965.
- Sugawara T., Noshita N., Lewen A., Gasche Y., Ferrand-Drake M., Fujimura M., Morita-Fujimura Y. and Chan P. H. (2002) Overexpression of copper/zinc superoxide dismutase in transgenic rats protects vulnerable neurons against ischemic damage by blocking the mitochondrial pathway of caspase activation. *J. Neurosci.* **22**, 209–217.
- Thannickal V. J. and Fanburg B. L. (2000) Reactive oxygen species in cell signaling. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **279**, L1005–L1028.
- Verheij M., Bose R., Lin X. H. *et al.* (1996) Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis. *Nature* **380**, 75–79.
- Vernet-der Garabedian B., Lemaigre-Dubreuil Y., Delhaye-Bouchaud N. and Mariani J. (1998) Abnormal IL-1 β cytokine expression in the cerebellum of the ataxic mutant mice staggerer and lurcher. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **62**, 224–227.
- Vu-Dac N., Gervois P., Grotzinger T., De Vos P., Schoonjans K., Fruchart J. C., Auwerx J., Mariani J., Tedgui A. and Staels B. (1997) Transcriptional regulation of apolipoprotein A-I gene expression by the nuclear receptor ROR α . *J. Biol. Chem.* **272**, 22 401–22 404.
- White K. P., Rifkin S. A., Hurban P. and Hogness D. S. (1999) Microarray analysis of *Drosophila* development during metamorphosis. *Science* **286**, 2179–2184.
- Whittemore E. R., Loo D. T. and Cotman C. W. (1994) Exposure to hydrogen peroxide induces cell death via apoptosis in cultured rat cortical neurons. *Neuroreport* **5**, 1485–1488.
- Willaime S., Vanhoutte P., Caboche J., Lemaigre-Dubreuil Y., Mariani J. and Brugg B. (2001) Ceramide-induced apoptosis in cortical neurons is mediated by an increase in p38 phosphorylation and not by the decrease in ERK phosphorylation. *Eur. J. Neurosci.* **13**, 2037–2046.

- Willaime-Morawek S., Brami-Cherrier K., Mariani J., Caboche J. and Brugg B. (2003) C-Jun N-terminal kinases/c-Jun and p38 pathways cooperate in ceramide-induced neuronal apoptosis. *Neuroscience* **119**, 387–397.
- Zanjani H. S., Mariani J., Delhay-Bouchaud N. and Herrup K. (1992) Neuronal cell loss in heterozygous staggerer mutant mice: a model for genetic contributions to the aging process. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **67**, 153–160.
- Zennou V., Petit C., Guetard D., Nerhbass U., Montagnier L. and Charneau P. (2000) HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap. *Cell* **101**, 173–185.
- Zennou V., Serguera C., Sarkis C., Colin P., Perret E., Mallet J. and Charneau P. (2001) The HIV-1 DNA flap stimulates HIV vector-mediated cell transduction in the brain. *Nat. Biotechnol.* **19**, 446–450.
- Zufferey R., Nagy D., Mandel R. J., Naldini L. and Trono D. (1997) Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat. Biotechnol.* **15**, 871–875.
- Zufferey R., Donello J. E., Trono D. and Hope T. J. (1999) Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *J. Virol.* **73**, 2886–2892.

I. Rôle de ROR α dans la survie neuronale:
2. La surexpression de ROR α permet une meilleure survie des cellules de Purkinje en culture organotypique

I.2. La surexpression de ROR α permet une meilleure survie des cellules de Purkinje en culture organotypique

Nous avons montré dans l'article I qu'une surexpression de ROR α pouvait exercer un rôle neuroprotecteur dans des neurones corticaux en culture soumis à un stress oxydatif. Afin de déterminer si ROR α pouvait exercer un rôle neuroprotecteur dans les cellules de Purkinje, nous avons étudié la survie de cellules de Purkinje qui surexpriment l'isoforme humaine de ROR α 1 en culture organotypique.

Afin de surexprimer ROR α dans des cellules de Purkinje, nous avons utilisé le même vecteur lentiviral que celui utilisé dans les neurones corticaux, et nous avons infecté des cultures organotypiques de cervelet (le protocole est identique à celui décrit en détail dans la section "experimental procedures" de l'article II, page 140 de ce manuscrit). Les cultures sont obtenues en réalisant des tranches parasagittales de cervelet de souris à différents âges (âge embryonnaire E17, ou âge postnatal 0 (P0), P3, P5). Afin de surexprimer ROR α (ou GFP pour les contrôles), les tranches de cervelet de 350 μ m d'épaisseur sont mises en contact avec le lentivirus juste après l'étalement des tranches sur les membranes de culture. Ce vecteur est très efficace pour surexprimer le transgène hROR α 1 dans les neurones corticaux (voir article I); il s'est révélé également très efficace pour surexprimer un transgène dans les cellules de Purkinje en culture organotypique: en effet, 80% des cellules de Purkinje en culture sont transduites par le vecteur Lenti-hROR α 1 ou Lenti-GFP pour les contrôles (voir figure 2 de l'article II).

Les cultures organotypiques de cervelet permettent une bonne survie des cellules de Purkinje en culture. Cependant, dans ces conditions, les cellules de Purkinje subissent une apoptose massive lors d'une mise en culture entre P1 et P5, P3 étant l'âge qui permet la moins bonne survie (Dusart *et al.*, 1997; Ghomari *et al.*, 2000). En revanche la mise en culture de tranches de cervelet d'animaux plus jeunes ou plus âgés entraîne une apoptose beaucoup moins importante. Cette apoptose massive entre P1 et P5 pourrait ainsi être le reflet d'une apoptose développementale qui interviendrait de façon naturelle *in vivo* (Dusart *et al.*, 1997; Ghomari *et al.*, 2000).

I. Rôle de ROR α dans la survie neuronale:
2. La surexpression de ROR α permet une meilleure survie des cellules de Purkinje en culture organotypique

Dans ce modèle, nous avons évalué et comparé la survie des cellules de Purkinje qui surexpriment ROR α (infectées par le Lenti-hROR α 1) ou qui expriment ROR α de façon endogène (cultures contrôles, infectées par le Lenti-GFP). Pour quantifier la survie, j'ai compté les cellules de Purkinje transduites (cellules de Purkinje GFP-positives ou surexprimant ROR α) issues de cultures réalisées à différents âges et qui survivent après 7 jours en culture. Pour chaque expérience, la totalité des cellules de Purkinje de toutes les tranches a été comptée. Cette quantification a été réalisée dans 3 expériences indépendantes. La significativité statistique a été réalisée à l'aide d'un test *t* de Student, où $p < 0,05$ est considéré comme significativement différent du contrôle au même âge, et indiqué par une étoile dans le graphique.

Les résultats montrent que ROR α permet une meilleure survie des cellules de Purkinje en culture organotypique à tous les âges: la survie des cellules de Purkinje est significativement plus importante pour celles qui surexpriment ROR α . Cependant, on peut observer que la protection diminue de P0-7DIV à P5-7DIV, suggérant que l'effet neuroprotecteur de ROR α diminue entre P0 et P5.

Ceci indique que ROR α exerce un effet neuroprotecteur dans les cellules de Purkinje, et pourrait donc protéger les cellules de Purkinje pendant le développement et le vieillissement. Des études complémentaires sont nécessaires pour déterminer le mécanisme par lequel ROR α exerce cette neuroprotection.

I. Rôle de ROR α dans la survie neuronale:
 2. La surexpression de ROR α permet une meilleure survie des cellules de Purkinje en culture organotypique

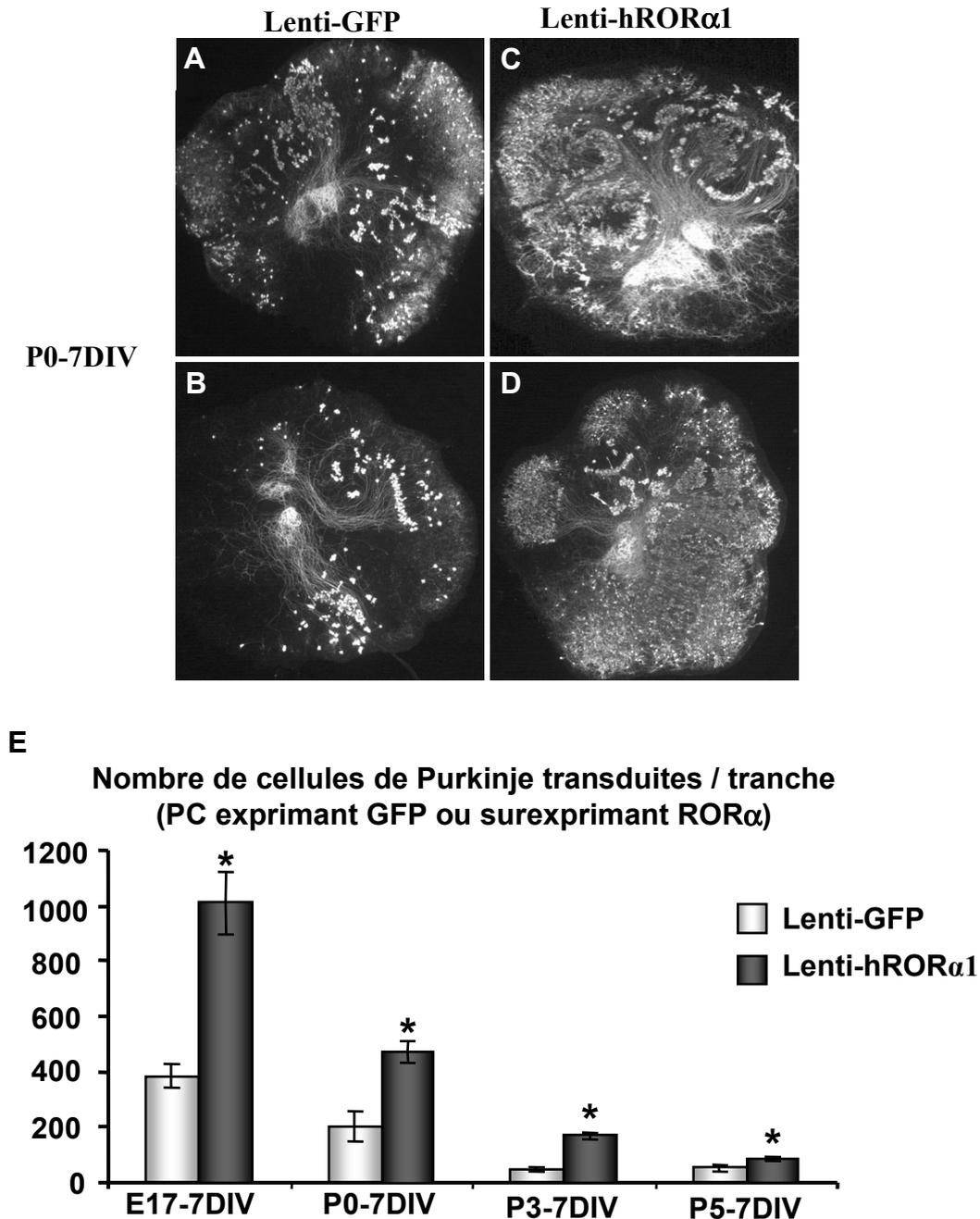


Figure 36: Survie des cellules de Purkinje surexprimant hROR α 1 en culture organotypique.

A-D: Tranches de cervelet à P0 et gardées en culture pendant 7 jours en culture. Les cellules de Purkinje sont révélées (en blanc) à l'aide d'un marquage immunofluorescent de la calbindine. Les tranches sont infectées avec le Lenti-GFP (contrôles; A, B) ou le Lenti-hROR α 1 (C, D). E: Quantification de la survie des cellules de Purkinje surexprimant ROR α à différents âges, après 7 jours en culture. (* $p < 0.05$; test t de Student).

II. ROLE DE ROR α DANS LA DIFFERENCIATION NEURONALE

Alors que les pertes neuronales sont les phénomènes les plus visibles dans le cervelet des souris chez lesquelles le gène *Rora* est délété, les anomalies de différenciation des cellules de Purkinje survivantes chez les mutants sont néanmoins importantes: chez l'adulte elles présentent un grand nombre de caractéristiques embryonnaires. Bien que ces anomalies aient été décrites depuis de très nombreuses années, le rôle précis de ROR α dans le processus de différenciation des cellules de Purkinje n'était pas établi. La faible prolifération puis la dégénérescence des cellules granulaires au moment où les cellules de Purkinje développent normalement leur arborisation dendritique entraîne une atrophie du cervelet qui rend difficile l'analyse de la progression de la différenciation de l'arbre dendritique *in vivo*. Le modèle de culture organotypique présente de nombreux avantages, tout du moins pour des cultures réalisées avant l'âge de P7. D'une part, il permet de maintenir une certaine intégrité du tissu cérébelleux (les connexions entre les cellules sont maintenues), ce qui permet un développement des cellules en culture qui reproduit celui intervenant *in vivo*. D'autre part, il permet de suivre individuellement la morphologie des cellules de Purkinje.

Afin d'établir le rôle de ROR α dans la différenciation des cellules de Purkinje, nous avons étudié - dans un modèle de culture organotypique de cervelet - la progression de la différenciation de ces cellules de Purkinje chez lesquelles ROR α est exprimé normalement (sauvages, *Rora*^{+/+}), ou absent (*Rora*^{sg/sg}), ou encore surexprimé (transduites par le vecteur lentiviral recombinant exprimant l'isoforme hROR α 1). Ces résultats font l'objet de l'article II (voir §II.1).

Par ailleurs, plusieurs études ont suggéré ou montré une interaction entre le récepteur de l'hormone thyroïdienne (TR) et ROR α . Afin de déterminer si une interaction existe entre hormones thyroïdiennes et ROR α pendant la différenciation des cellules de Purkinje, nous avons étudié les effets de l'hormone thyroïdienne T₃ sur le développement précoce des cellules de Purkinje en culture organotypique. Ces résultats encore préliminaires sont décrits dans un article en préparation (article III; voir §II.2).

II. Rôle de ROR α dans la différenciation neuronale :1. Article II - ROR α contrôle les étapes précoces de la différenciation des cellules de PurkinjeII.1. ROR α contrôle les étapes précoces de la différenciation des cellules de Purkinje**Article II: ROR α controls the early steps of Purkinje cell dendritic differentiation.**

Fatiha Boukhtouche, Sonja Janmaat, Guilan Vodjdani, Vanessa Gautheron, Jacques Mallet, Isabelle Dusart & Jean Mariani.

Journal of Neuroscience, sous presse, 2006.

Afin d'analyser le rôle de ROR α dans la différenciation neuronale, nous avons étudié, en culture organotypique, la progression de la différenciation des cellules de Purkinje sauvages, déficientes pour ROR α ou surexprimant ROR α .

Comme déjà décrit dans la partie I des résultats, le vecteur lentiviral recombinant Lenti-GFP ou Lenti-hROR α 1 que nous avons construit et utilisons dans cette étude permet une transduction stable de la plupart des cellules de Purkinje en culture.

Nous avons tout d'abord analysé la différenciation des cellules de Purkinje dans notre modèle de culture organotypique. Les cellules de Purkinje se différencient en suivant le même processus que celui décrit *in vivo* chez le rat. Les cellules de Purkinje embryonnaires ont une morphologie bipolaire (réminiscente de leur morphologie pendant leur migration); lors de leur différenciation, la première étape consiste en une régression de ces neurites avant la croissance de l'arbre dendritique proprement dit.

Dans cette étude, nous montrons que ROR α intervient de façon cruciale dans cette étape de régression qui précède l'élaboration de l'arbre dendritique. En effet, la surexpression de ROR α dans des cellules de morphologie bipolaire entraîne l'accélération de la régression des dendrites, alors que l'absence de ROR α entraîne un arrêt du processus de différenciation à cette étape: les cellules de Purkinje provenant de cervelet de souris *Rora^{sg/sg}* ne subissent pas la régression normale des dendrites. La restauration de l'expression de ROR α quant à elle permet de restaurer le processus normal de différenciation.

II. Rôle de ROR α dans la différenciation neuronale :**1. Article II - ROR α contrôle les étapes précoces de la différenciation des cellules de Purkinje**

Nos résultats démontrent que l'action intrinsèque de ROR α est cruciale pour le processus de différenciation précoce, et confortent l'hypothèse que les premières étapes de différenciation des cellules de Purkinje sont dépendants de mécanismes génétiques intrinsèques, contrairement au développement plus tardif de l'arborisation; cette dernière semble nécessiter des facteurs extrinsèques, tels que les facteurs trophiques ou l'activité électrique dépendante des connexions synaptiques établies avec les afférences des cellules de Purkinje.

Retinoid-Related Orphan Receptor α Controls the Early Steps of Purkinje Cell Dendritic Differentiation

Fatiha Boukhtouche,¹ Sonja Janmaat,¹ Guilan Vodjdani,² Vanessa Gautheron,¹ Jacques Mallet,² Isabelle Dusart,¹ and Jean Mariani¹

¹Université Pierre et Marie Curie–Paris6, Unité Mixte de Recherche (UMR) 7102–Neurobiologie des Processus Adaptatifs (NPA); Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), UMR 7102–NPA, Paris, F-75005 France, and ²Université Pierre et Marie Curie–Paris6, UMR 7091–Génétique Moléculaire de la Neurotransmission et des Processus Neurodégénératifs (LGN); CNRS, UMR 7091–LGN, Paris, F-75013 France

Dendritic differentiation involves both regressive and growth events. The mechanisms controlling the regressive events are poorly understood. This study is aimed at determining the role of the nuclear receptor retinoid-related orphan receptor α (ROR α) in Purkinje cell (PC) dendritic differentiation in organotypic cultures. As observed *in vivo*, in these cultures, fusiform PCs with embryonic bipolar shape undergo regression before the outgrowth of the ultimate dendritic tree. We show that lentiviral-mediated hROR α 1 overexpression in fusiform PCs leads to a cell-autonomous accelerated progression of dendritic differentiation. In addition, ROR α is necessary for the PC regressive events: whereas *staggerer* ROR α -deficient PCs remain in the embryonic fusiform stage, replacement of hROR α 1 restores normal dendritogenesis. These results demonstrate that ROR α expression in fusiform PCs is crucial for the dendritic regression and progression of the following step of extension of dendritic processes. However, it does not seem to participate to the last stage of dendritic growth. This study identifies ROR α as a nuclear receptor crucial for the control of dendritic remodeling during development.

Key words: ROR α ; Purkinje cells; dendritic regression; differentiation; lentiviral vector; organotypic culture

Introduction

Like most postmitotic neurons, cerebellar Purkinje cells (PCs) have a bipolar shape during their migration. Once they reach their terminal domains, these immature PCs follow a process of dendritic regression, before extending apical dendrites from which the ultimate and characteristic dendritic tree will arise. Dendritic differentiation thus involves both regressive and growth events (Ramón y Cajal, 1911; Armengol and Sotelo, 1991). However, although numerous factors have been implicated in the late phases of dendritic growth (Schilling et al., 1991; Baptista et al., 1994; Mount et al., 1995; Hirai and Launey, 2000; Metzger and Kapfhammer, 2000; Heuer and Mason, 2003; Swinny et al., 2004), to our knowledge, factors involved in the early dendritic differentiation steps, in particular the regressive phase, are unknown.

The retinoid-related orphan receptor α (ROR α)-deficient *staggerer* mutant mouse displays a cerebellar atrophy caused by an early cell-intrinsic death of most of the PCs, along with sec-

ondary degeneration of granule cells and inferior olivary neurons (Sotelo and Changeux, 1974; Herrup, 1983; Zanjani et al., 1990; Hamilton et al., 1996; Steinmayr et al., 1998). Interestingly, in the few surviving PCs, the dendritic differentiation is impaired, because these remaining PCs have atrophic dendrites, lacking distal spiny branchlets (Bradley and Berry, 1978; Sotelo, 1978, 1990). PCs in primary mixed cerebellar cultures from homozygous *staggerer* mutant mice do not progress beyond the early migratory morphology (Shirley and Messer, 2004). Together with the dendritic atrophy, many other immature features remain, such as PC polyinnervation by climbing fibers (Crepel et al., 1980a; Mariani and Changeux, 1980). In addition, expression of many genes has been shown to be altered, such as *Pcp-2/L7* (Hamilton et al., 1996), calmodulin (Messer et al., 1990), and *sonic hedgehog* (Gold et al., 2003). From all of these studies, it was not possible to conclude about the precise role of ROR α in the dendritic differentiation process, most likely attributable to the difficulty in studying the differentiation progression *in vivo* from the early bipolar PCs in the atrophic and disorganized *staggerer* cerebellum, in which most of the PCs undergo cell death. In the present study, we aimed at determining the involvement of ROR α in the progression of dendritic differentiation from the early bipolar PCs, by using both *staggerer* ROR α -deficient PCs and ROR α -overexpressing PCs in organotypic cultures.

To address this question, ROR α -overexpressing PCs were obtained by infecting mouse cerebellar organotypic cultures with a lentiviral (Lenti)-derived vector encoding hROR α 1. PCs in organotypic cultures differentiate with the same sequence as that ob-

Received Oct. 28, 2005; revised Dec. 15, 2005; accepted Dec. 18, 2005.

This research was supported by grants from Fondation pour la Recherche Médicale (F.B.), Fondation Lejeune (F.B.), and Le Groupement d'Intérêt Scientifique Institut de la Longévité (J.M.). We are grateful to Dr. Constantino Sotelo for helpful discussions and critical review of this manuscript and Dr. Ann Lohof for her critical reading of this manuscript. We thank Rosine Wehrlé for her technical help and also Drs. Bernard Brugg and Yolande Lemaigre-Dubreuil for their support.

Correspondence should be addressed to Fatiha Boukhtouche, Neurobiologie des Processus Adaptatifs, Unité Mixte de Recherche 7102, Université Pierre et Marie Curie Case 14, 9 quai St-Bernard, 75005 Paris, France. E-mail: fatiha.boukhtouche@snv.jussieu.fr.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.4636-05.2006

Copyright © 2006 Society for Neuroscience 0270-6474/06/261531-08\$15.00/0

served *in vivo* in the rat. Our results show that ROR α controls initial PC dendritic development, particularly the transition phase from the fusiform cell to the PC stellate cell (the regressive stage), and accelerates the following steps of dendritic development. In contrast, ROR α does not seem to have a major role in the last phase of PC dendritic growth. Thus, our study identifies for the first time a factor implicated in the early steps of the PC dendritic differentiation and most particularly in the regressive steps.

Materials and Methods

Recombinant lentiviral production, titrations, and transduction efficiency

DNA constructs. The backbone of the lentiviral construct (pFlap) carries the DNA flap sequence (Zennou et al., 2001) and is deleted for the human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) enhancer and promoter sequences in the U3 region of the 3' long-terminal repeat (Sirven et al., 2001). The human 1.6 kb hROR α 1 cDNA fragment was inserted into the pFlap Δ U3.PGK-WPRE transfer vector and placed under the control of the phosphoglycerate kinase (PGK) promoter, followed by a 600 bp post-translational regulatory element WPRE (woodchuck posttranscriptional regulatory element) (Zufferey et al., 1999).

Lentiviral production. Stocks of lentiviral vector were prepared by transient cotransfection of HEK293T cells with the p8.91 encapsidation plasmid (Δ Vpr Δ Vif Δ Vpu Δ Nef) (Zufferey et al., 1997), pHCMV-G, and the recombinant gene transferring vector, as described previously (Zennou et al., 2000). Briefly, the supernatants were treated with DNaseI (Roche Products, Welwyn Garden City, UK) before ultracentrifugation and then resuspended in PBS, aliquoted, and stored at -80°C until use. The amount of p24 capsid protein was determined by the HIV-1 p24 ELISA antigen assay (Beckman Coulter, Fullerton, CA). Virus from different virus stock productions averaged 150 ng/ μl p24.

The titration of each vector stock was determined by infecting HEK293T cells derived from human embryonic kidney. HEK293T cells were grown at 37°C in DMEM supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (Invitrogen, Carlsbad, CA). Cells were plated in 24-well plates, and viral contact was performed for 1 h in a minimal volume (100 μl) in the absence of serum with increasing amounts of each lentiviral suspension, after which fresh complete medium was added. After a 48 or 72 h incubation period, cells were washed with PBS, detached with trypsin, fixed in 4% paraformaldehyde, and analyzed. Titer of the virus production was evaluated by calculating the transducing units (TU) after 48 and 72 h in culture using the $\text{TU} = fC_0V$ formula, where f is the frequency of green fluorescent protein (GFP)- or ROR α -positive cells (as described for slices, see ROR α -immunolabeling procedures below), C_0 is the total number of target cells, and V is the volume of the viral stock used. Titers from different virus productions averaged 1.7×10^9 TU/ml.

Animals

Animal housing and all procedures were performed in accordance with the guidelines of the French Ministry of Agriculture and the European Community.

The *staggerer* ROR α ^{sg/sg} mutant mice were maintained on a C57BL/6J genetic background in our colony. ROR α ^{sg/sg} and their ROR α ^{+/+} littermates were obtained by intercrossing fertile heterozygous ROR α ^{+/-} animals and were genotyped by PCR. Genomic DNA was extracted from tail biopsy and amplified in two reactions, one for each allele. The *staggerer* ROR α ^{sg} allele primers were as follows: 5'-CGTTTGGCAAACCCACC-3' and 5'-GATTGAAAGCTGACTCGTTCC-3'. The ROR α ⁺ allele primers were as follows: 5'-TCTCCCTTCTCAGTCCTGACA-3' and 5'-TATATCCACC-ACACGGCAA-3'. The amplified fragments (318 and 450 bp for ROR α ⁺ and ROR α ^{sg} alleles, respectively) were detected by electrophoresis on an agarose gel.

Swiss mice were obtained from Janvier (Le Genest-St-Isle, France).

Slice cultures

Swiss mice at embryonic day 17 (E17), postnatal day 0 (P0), or P7 were used. E0 was the mating day, and P0 was the day of birth. Organotypic cultures of cerebellum were prepared as described previously (Ghoumari et al., 2002). Briefly, after decapitation, brains were dissected out into

cold Gey's balanced salt solution (Sigma, St. Louis, MO) supplemented with 5 mg/ml glucose, and the meninges were removed. Parasagittal cerebellar slices (350 μm thick) were cut on a McIlwain tissue chopper and transferred onto 30 mm Millipore membrane culture inserts with a 0.4 μm pore size (Millicell CM; Millipore, Bedford, MA). The PCs were then infected by adding directly onto the slices the volume of viral stock (Lenti-hROR α 1 and Lenti-GFP) corresponding to 1.7×10^6 TU. Slices were maintained in culture in six-well plates containing 1 ml/well of medium containing 50% basal medium with Earle's salts (BME) (Invitrogen), 25% HBSS (Invitrogen), 25% horse serum (Invitrogen), 1 mM L-glutamine, and 5 mg/ml glucose at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. The medium was replaced every 2–3 d.

Mice obtained from ROR α ^{+/-} intercrosses were also used in this study. In these litters, ROR α ^{+/+}, ROR α ^{+/-}, and ROR α ^{sg/sg} mice could be generated. In ROR α replacement experiments, slices of each cerebellum were divided between two Millicells. For each animal, half of cerebellar slices served as control and were infected with Lenti-GFP and the other half with Lenti-hROR α 1 to compare control (Lenti-GFP) versus ROR α -overexpressing PCs from the same animals. The genotype was determined a posteriori by PCR on tail biopsy, in blind studies.

Antibodies and staining procedures

Cerebellar slices were fixed in 4% paraformaldehyde in 0.12 M PBS, pH 7.4, for 1 h at room temperature. After washing in PBS, the slices were incubated for 1 h in PBS containing 0.25% Triton X-100, 0.2% gelatin, 0.1% sodium azide (PBSGTA), and 0.1 M lysine. Then rabbit polyclonal anti-28 kDa calbindin calcium-binding protein (CaBP) antibody (1:5000 dilution; Swant, Bellinzona, Switzerland) to visualize PCs and goat polyclonal anti-ROR α 1 (sc-6062; 1:4000 dilution; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) in PBSGTA were applied overnight. At this dilution, in control slices, the intensity of ROR α labeling was always weak. Therefore, in Lenti-hROR α 1-infected slices, the higher intensity of ROR α labeling in ROR α -overexpressing PCs could be unambiguously distinguished from the weak intensity of ROR α labeling attributable to endogenous expression. After 2 h incubation with cyanine 3-conjugated donkey anti-rabbit (1:500 dilution; Jackson ImmunoResearch Europe, Soham, Cambridgeshire, UK; Interchim, Montluçon, France) and FITC-conjugated donkey anti-goat (1:2000 dilution; Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA), the slices were washed several times in PBS and mounted in mowiol (Calbiochem, La Jolla, CA). The slices were analyzed with an inverted microscope (Eclipse TE 300; Nikon, Tokyo, Japan). Immunofluorescence images were captured at 400 \times magnification using a Qimaging Retiga 1300 camera (VayTek, Fairfield, IA) and analyzed using Image-Pro Plus 4.1 software (Media Cybernetics, Silver Spring, MD).

Classification of PC differentiation stages

Classification of PCs was assessed after calbindin immunostaining among the transduced PCs (identified by GFP and CaBP expression for Lenti-GFP-infected slices or by the double ROR α and CaBP immunolabeling for Lenti-hROR α 1-infected slices). Images were taken from all slices, corresponding to at least 100 PCs in each experiment. Quantification was performed on three independent experiments.

With few adaptations, we classified PCs according to the different stages described previously during postnatal rat development (Armengol and Sotelo, 1991). Fusiform PCs with a bipolar shape, reminiscent of embryonic migratory PCs, are defined as stage I (see Fig. 1A). This stage I corresponds to both "simple" and "complex" fusiform stages, observed from E16 to P4 *in vivo*. Stage II comprised PCs with short processes all around the soma (see Fig. 1B). This "stellate" stage includes both "regressive-atrophic dendrites" and "stellate cell" stages described previously, from P2 to P6 *in vivo*. PCs with one to three perisomatic protrusions are defined as stage III (see Fig. 1C). They correspond to PCs at approximately P5–P10 *in vivo*. Finally, PCs with one or more identified dendritic trees (defined as primary dendrites giving rise to additional side branches) are classified as stage IV. Interestingly, dendritic spine-like structures are observed only on PCs in stages III and IV.

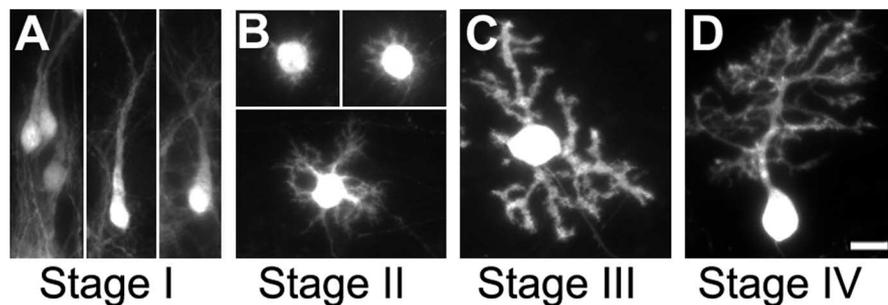


Figure 1. Classification of PC differentiation stages in organotypic cultures. CaBP-immunolabeled PCs from slices cultured at P0 and maintained in culture for 3 d (**A**), 7 d (**B**), 10 d (**C**) or 14 d (**D**). **A**, Fusiform PCs with a bipolar shape are defined as stage I. **B**, PCs with regressive-atrophic dendrites all around the soma are defined as stage II. **C**, PC with one or more perisomatic protrusions is defined as stage III. **D**, PC with identified dendritic tree is classified in stage IV. Scale bar, 20 μ m.

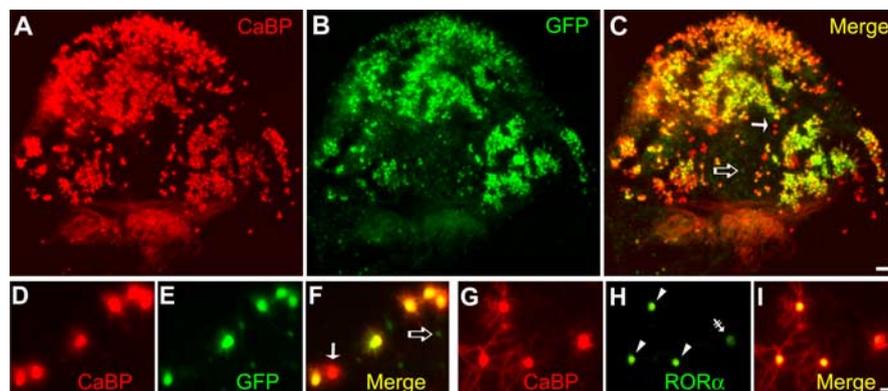


Figure 2. Lentiviral-mediated transduction in organotypic cerebellar cultures. P0 plus 7 DIV cultured cerebellar slices at low (4 \times) magnification (**A–C**) or at higher (20 \times) magnification (**D–I**) infected with Lenti-GFP (**A–F**) or with Lenti-hROR α 1 (**G–I**) vectors. **A–F**, PCs are visualized with PC-specific CaBP immunolabeling in red (**A**, **C** and **D**, **F**), and Lenti-GFP-transduced PCs are revealed by green GFP expression (**B**, **C** and **E**, **F**). GFP-expressing PCs appear as yellow cells in merged images (**C**, **F**). In **C** and **F**, white arrows indicate PCs nontransduced by the Lenti-GFP vector, and open arrows indicate non-PC GFP-expressing cells. **G–I**, PCs revealed in red (**G**, **I**), and ROR α -expressing cells are immunolabeled in green (**H**, **I**). hROR α 1-overexpressing PCs appear as red cells with intense yellow nuclei in the merged image (**I**). In **H**, arrowheads indicate Lenti-hROR α 1-transduced cells with intense ROR α immunolabeling, whereas the double-crossed arrow shows the weak intensity of ROR α immunolabeling in a cell with endogenous ROR α expression. Scale bars: **A–C**, 100 μ m; **D–I**, 20 μ m.

Quantitative morphological analysis of Purkinje cell dendritic trees

The dendritic morphology of Purkinje cells in stage IV was quantitatively analyzed in cells that had no or little overlap of dendrites with neighboring cells as described previously (Metzger and Kapfhammer, 2000). All quantifications were performed on either Lenti-GFP-transduced PCs (identified by the coexpression of CaBP and GFP for the controls) or on Lenti-hROR α 1-transduced PCs for hROR α 1-overexpression experiments (identified by the coexpression of ROR α and CaBP). Using Image-Pro Plus 4.1 software, two parameters were measured in blind studies from the immunofluorescence images: (1) the dendritic tree area, by connecting the ends of all terminal dendritic tips of a single Purkinje cell, including the soma with straight lines; and (2) the length of the longest dendrite (i.e., distance between the cell body and the most distal dendritic ending). For each experiment, at least 50 PCs from all slices were quantified. Quantification was performed from three independent experiments.

Statistical analysis

Independent experiments were performed with 10–12 cerebellar slices per sample and repeated three times using matched controls. For PC stage quantification, at least 100 PCs were analyzed in each sample. For the quantitative morphological analysis of PC dendritic tree, at least 50 PCs from each slice were quantified from each sample. Results are expressed in figures and in the text as mean \pm SD. The statistical significance of differences between PCs

transduced with either Lenti-GFP or Lenti-hROR α 1 was assessed by a Student's *t* test using Statview software (SAS Institute, Cary, NC).

Results

Lentiviral-mediated gene transfer is adapted to the study of PC dendritic development in organotypic culture

At birth, *in vivo*, most murine PCs are fusiform (bipolar shape; stage I) (data not shown), as described for rats (Armengol and Sotelo, 1991). When cultured at P0, most PCs in organotypic slices were still in stage I after 3 d *in vitro* (DIV) (P0 plus 3 DIV) (Fig. 1A). They retracted their primitive dendrites (stage II) after 7 DIV (Fig. 1B) and elongated numerous perisomatic protrusions (stage III) after 10 DIV (Fig. 1C). Finally, they developed their ultimate dendritic trees (stage IV) after 14 DIV (Fig. 1D). Thus, in organotypic culture, PC dendritic development undergoes the same pattern of differentiation as that observed *in vivo*.

To study the role of ROR α in PC dendritic development, we used a recombinant nonreplicative lentiviral-derived vector encoding either hROR α 1 (Lenti-hROR α 1) or GFP (for control, Lenti-GFP) under the control of the PGK promoter to overexpress ROR α in PCs in cerebellar organotypic cultures.

A large number of PCs were transduced with both lentiviral vectors. In slices infected with the Lenti-GFP vector, >80% of the calbindin (CaBP)-positive PCs expressed GFP (Fig. 2A–C). The same transduction efficiency was observed with the Lenti-hROR α 1 vector (data not shown). Interestingly, the lentiviral vector seems to preferentially transduce PCs, because most of the GFP-expressing or ROR α -overexpressing cells were PCs (very few other cellular types were transduced) (Fig. 2D–I). Thus, unlike classical transfection methods, transferring a transgene by the lentiviral vector approach appears to be very efficient in PCs.

Using Lenti-GFP, we then analyzed whether lentiviral infection interferes with PC survival and dendritic differentiation. In PCs, transduction with Lenti-GFP was easily detectable by the appearance of GFP fluorescence in CaBP-immunolabeled PCs. No differences in survival (data not shown) or in dendritic differentiation were detected between nontransduced PCs and control Lenti-GFP-transduced PCs (Fig. 2D–F). The lentiviral infection is therefore adapted to the study of dendritic differentiation.

To distinguish PCs with endogenous ROR α expression from those with the lentiviral-mediated ROR α overexpression in Lenti-hROR α 1-infected slices, we revealed ROR α using a low antibody concentration (1:4000). At this dilution, the background labeling of endogenous ROR α expression (Fig. 2H, double-crossed arrow) could be unambiguously distinguished from the high intensity of ROR α -overexpressing PCs (Fig. 2H, arrowheads). ROR α immunostaining was always confined to the

nucleus, whatever its expression level. Thus, Lenti-hROR α 1 is an efficient tool to overexpress ROR α in PCs.

hROR α 1 overexpression in PCs accelerates dendritic differentiation through stages I to IV

Most PCs from either E17 or P0 slices after 7 DIV displayed regressive-atrophic dendrites and were thus in the stellate stage II (Fig. 3A,D,L,O). In contrast, when ROR α was overexpressed by Lenti-hROR α 1 transduction, the majority of PCs exhibited dendritic trees stemming from one or more identified primary branches (stage IV) after 7 d in culture in both E17 and P0 slices (Fig. 3B,D,M,O).

To determine whether hROR α 1-overexpressing PCs undergo the normal differentiation steps, i.e., pass through a regressive phase (stage II) before reaching the stage IV, we analyzed the differentiation stages of P0 PCs at intermediate culture times (after 3 and 5 d in culture). After 3 d in culture (P0 plus 3 DIV), 94.3% of controls PCs were still in stage I (Fig. 3E,G), whereas 58.8% of hROR α 1-overexpressing PCs have already reached stage II (Fig. 3F,G). Moreover, hROR α 1-overexpressing PCs at P0 plus 5 DIV were mostly in stage III (57.5%) (Fig. 3I,K), when controls PCs have just reached stage II (57.7%) (Fig. 3H,K). Furthermore, we could detect filopodia and dendritic spines (which are characteristics of dendrites in stages III and IV in control PCs) on all stage III and stage IV hROR α 1-overexpressing PCs, suggesting a normal differentiation process (Fig. 3C,J,N). From these experiments, we can conclude that hROR α 1-overexpressing PCs undergo a normal, but accelerated, progression through stages II and III before reaching stage IV at P0 plus 7 DIV (Fig. 3M,O), whereas control PCs are still in stage II (Fig. 3L,O).

hROR α 1 overexpression does not increase late dendritic differentiation

To determine whether ROR α is involved in the final dendritic differentiation step, we assessed the effect of hROR α 1 overexpression at later stages. Cerebellar slices of P7 mice (stage III at the beginning of the culture) were infected with either Lenti-GFP vector (control) or Lenti-hROR α 1 vector (hROR α 1-overexpressing PCs). The vast majority of control and hROR α 1-overexpressing PCs from P7 slices were in stage IV after 7 d *in vitro* (Fig. 4A–C). We were therefore in a favorable situation to determine whether ROR α plays a role in dendritic growth. We quantified the dendritic arborization as described previously (Metzger and Kapfhammer, 2000) by measuring the length of the longest dendrite (Fig. 4D) and the dendritic tree area (Fig. 4E) of stage IV PCs at P7 plus 7 DIV. The analyzed parameters, the length of the longest dendrite of each PC and the total dendritic area, should provide a clear indication on the effect of the hROR α 1 overexpression on dendritic growth in infected cells by comparing them with Lenti-GFP-transduced control PCs.

The quantitative evaluation of these parameters at P7 plus 7 DIV, illustrated in the histograms, comprise data obtained from

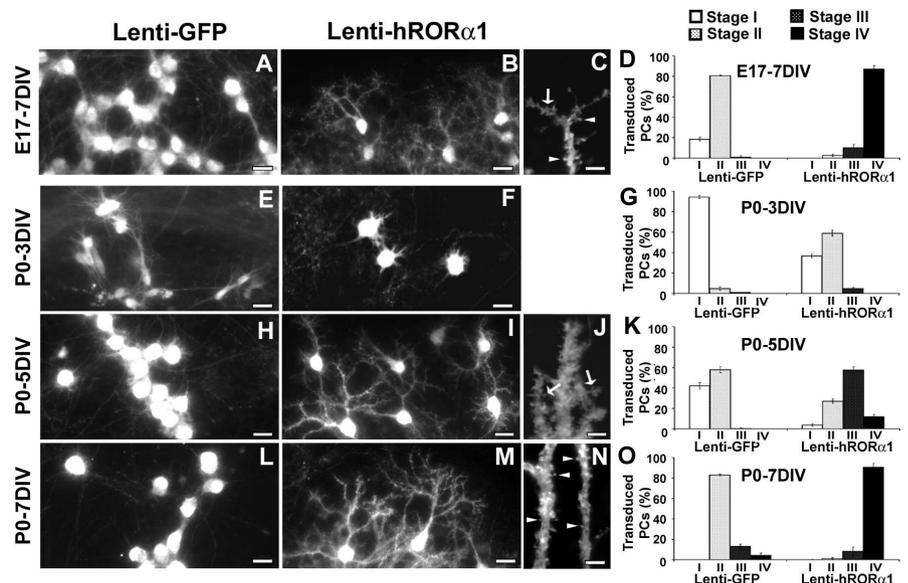


Figure 3. hROR α 1 overexpression accelerates dendritic differentiation. Images of PCs in organotypic cultures at E17 plus 7 DIV (A–C), P0 plus 3 DIV PCs (E, F), P0 plus 5 DIV (H–J), and P0 plus 7 DIV PCs (L–N), revealed with CaBP immunolabeling. Slices were infected with either Lenti-GFP (A, E, H, L) or Lenti-hROR α 1 (B, C, F, I, J, M, N) vectors. Transduced PCs were identified by GFP expression for Lenti-GFP or by ROR α immunolabeling for Lenti-hROR α 1 cultures. Note the presence of more mature hROR α 1-overexpressing PCs compared with Lenti-GFP-expressing PCs. C, J, N, High-magnification view of dendrites of stage IV PCs at E17 plus 7 DIV, P0 plus 5 DIV, and P0 plus 7 DIV, showing filopodia (arrows) and spine-like structures (arrowheads). D, G, K, O, Quantitative distribution of PCs between stages I to IV (stages are defined in Fig. 1). For all culture times, the PCs undergo an accelerated differentiation when hROR α 1 is overexpressed. Scale bars: A, B, E, F, H, I, L, M, 25 μ m (magnification, 20 \times); C, J, N, 5 μ m (magnification, 100 \times).

three independent experiments (morphometry of at least 50 single stage IV PCs was assessed in each independent experiment). Control GFP-expressing PCs had a mean longest-dendrite length of $110 \pm 7 \mu$ m, which is not significantly different ($p = 0.08$) from hROR α 1-overexpressing PCs ($126 \pm 9 \mu$ m). The mean tree areas were also similar ($7927 \pm 1323 \mu$ m² for hROR α 1-overexpressing PCs and $6288 \pm 510 \mu$ m² for control PCs; $p = 0.12$). These results show that hROR α 1-overexpressing PCs have a dendritic tree comparable with controls and suggest that ROR α does not participate in the late dendritic PC differentiation when overexpressed in PCs that are already in stage III.

ROR α -deficient Purkinje cells do not progress beyond the early migratory morphology

From the experiments above, ROR α appears to be a crucial factor controlling the early steps of PC differentiation. To test whether the absence of ROR α prevents the normal progression of these early steps, we analyzed the differentiation of PCs from *staggerer* (*Rora*^{sg/sg}) and corresponding control *Rora*^{+/+} cerebellar slices at P0, when PCs are in the early fusiform stage. Similarly to what was described above, we observed that most *Rora*^{+/+} PCs in organotypic slices at P0 were in stage II after 7 DIV (Fig. 5A) and in stage IV after 14 DIV (Fig. 5B). In contrast, all PCs from *Rora*^{sg/sg} cerebellum displayed the embryonic bipolar shape (stage I) after 7 d in culture (Fig. 5D). After 14 d in culture, *Rora*^{sg/sg} P0 PCs still displayed a bipolar shape (Fig. 5E), with an increased complexity: processes were longer and more branched compared with 7 DIV *Rora*^{sg/sg} PCs. However, PCs from *Rora*^{sg/sg} cerebellum in stage II, III, or IV were never observed, whether cultured from E17 or P3 animals (data not shown). Although *Rora*^{sg/sg} PCs did continue their dendritic extension from stage I, they failed to regress and remodel their shape as wild-type PCs did in organotypic culture.

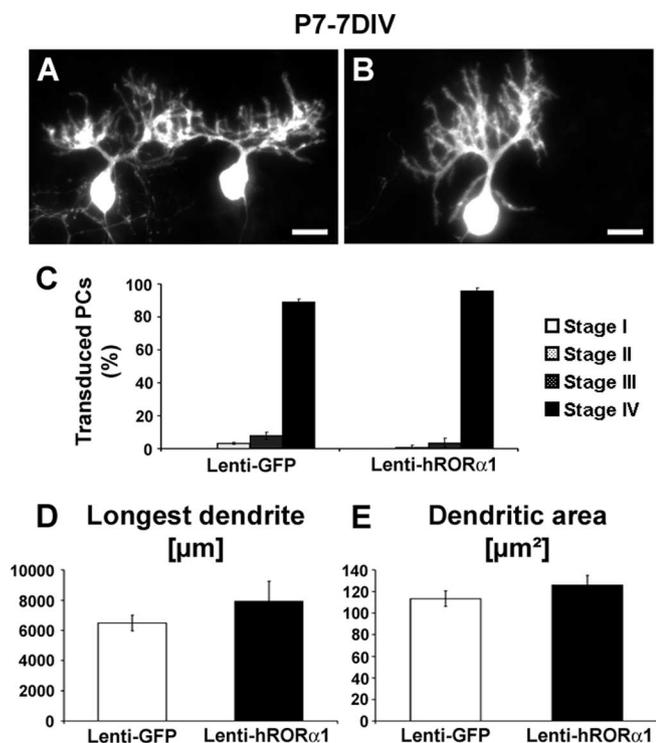


Figure 4. hROR α 1 overexpression does not influence late dendritic differentiation. PCs stained by CaBP immunolabeling in organotypic cultures of P7 cerebellar slices kept 7 d *in vitro*. Transduced PCs were identified by GFP expression for Lenti-GFP-infected slices (**A**) and by ROR α nuclear immunolabeling for Lenti-hROR α 1-infected slices (**B**); these PCs display a similar identified dendritic tree. **C**, The mean \pm SD values of the percentage of PCs in each stage show that both GFP-expressing and hROR α 1-overexpressing PCs are almost all in stage IV (stages are defined in Fig. 1). **D**, **E**, Quantitative evaluation of the morphological parameters of both GFP-expressing and hROR α 1-overexpressing PCs. The longest dendrite (**D**) and the total dendritic tree area (**E**) were measured. The mean longest dendrite and the mean dendritic tree area are similar in GFP-expressing PCs and in hROR α 1-overexpressing PCs. Data represent mean \pm SD of at least 50 transduced PCs investigated in three independent experiments (longest dendrite, $p = 0.08$; dendritic area, $p = 0.12$; Student's *t* test).

Dendritic spine-like structures began to appear after 14 DIV in wild type (Fig. 5C), although they were absent on dendrites of *Rora*^{sg/sg} PCs in culture after 14 DIV (Fig. 5F).

We conclude that, in organotypic cultures, the absence of ROR α impedes dendritic differentiation because ROR α -deficient PCs seem to be blocked in the early fusiform stage of PC differentiation and never achieve the PC stellate cell stage.

ROR α expression in *staggerer* Purkinje cells restores the dendritic differentiation progression

As described above, loss of function of ROR α in *Rora*^{sg/sg} PCs in culture leads to an arrest of the differentiation process in stage I (Fig. 5). To understand whether the *Rora*^{sg/sg} PC dendritic phenotype is a direct consequence of the absence of ROR α , we restored ROR α expression in *Rora*^{sg/sg} PCs by infecting them with Lenti-hROR α 1.

In *Rora*^{sg/sg} slices, the occurrence of efficiently transduced PCs is unambiguously revealed with the ROR α immunolabeling (Fig. 6C). In addition, because no ROR α labeling was detected in nontransduced explants taken from *Rora*^{sg/sg} cerebellum (data not shown), we can confirm the specificity of the anti-ROR α antibody used in this study.

When cultured and infected at P0 with the Lenti-GFP vector and kept 7 DIV (P0 plus 7 DIV), control GFP-expressing PCs in organotypic cultures of *Rora*^{sg/sg} cerebellum were in stage I (Fig.

6A,B), like *Rora*^{sg/sg} nontransduced PCs (Fig. 5D), and control GFP-expressing *Rora*^{+/+} PCs were in stage II (Fig. 6F,G), confirming the absence of effect of Lenti-GFP transduction on PC differentiation. In contrast, when ROR α was expressed by Lenti-hROR α 1 transduction in *Rora*^{sg/sg} PCs, most PCs displayed perisomatic protrusions (stage III) or dendritic trees stemming from one or more identified primary branches (stage IV) (Fig. 6C,D). Interestingly, in P0 plus 7 DIV hROR α 1-overexpressing cultures taken from wild-type or homozygous *staggerer* cerebella, all stage III and IV PCs displayed dendritic spine-like structures (Fig. 6E,J). This feature is similar to that observed after 14 DIV in wild-type cultures, which express endogenous *Rora* (Fig. 5C). Therefore, hROR α 1 overexpression in *Rora*^{sg/sg} PCs is sufficient to restore the regressive step and to induce a strong dendritic differentiation and normal spinogenesis.

Moreover, we observed that hROR α 1 overexpression in a given PC does not influence neighboring PCs. Indeed, hROR α 1-overexpression in PCs did not lead to an accelerated dendritogenesis of adjacent nontransduced PCs (Fig. 6H,I), indicating that the effect of ROR α in the early dendritic differentiation does not require secreted factors.

In conclusion, our results show that hROR α 1 overexpression in both wild-type and *Rora*^{sg/sg} PCs leads to a cell-autonomous acceleration of the transition from bipolar form (stage I) to stellate cell stage (stage II), which then ensures an appropriate progression of the subsequent dendritic development.

Discussion

Using cerebellar organotypic cultures, we have shown that PCs recapitulate all of the dendritic differentiation steps observed *in vivo* (Armengol and Sotelo, 1991), in accordance with previous studies (Hendelman and Aggerwal, 1980). PC dendrites differentiate from a fusiform shape to a regressive form before undergoing their final phase of dendritic differentiation.

In this study, we demonstrate that P0 hROR α 1-overexpressing PCs cultured 7 DIV (P0 plus 7 DIV) undergo their dendritogenic program more rapidly than control cells. In contrast, P7 hROR α 1-overexpressing PCs after 7 DIV exhibit neither significant qualitative nor quantitative differences in the studied morphological parameters when compared with GFP-expressing PCs. Moreover, we establish that, in organotypic cultures, ROR α is required for the dendritic differentiation process from bipolar fusiform PCs (stage I) to stellate stage PCs (stage II). This is in agreement with what has been shown previously by Shirley and Messer (2004) in dissociated PC cultures from *Rora*^{sg/sg} cerebella. The arrest of the normal differentiation process is unlikely to be attributable to the poor health of *Rora*^{sg/sg} PCs because, in organotypic cultures, *Rora*^{sg/sg} PCs survive better than *in vivo* (our unpublished results) and continue to elongate their processes (Fig. 5D,F). Although *Rora*^{sg/sg} PCs are blocked in stage I, ROR α replacement enabled them to regress their processes to differentiate into stage II and to pursue the formation of their ultimate dendritic trees. Together, these results position ROR α as an important transcription factor in the control of dendritic remodeling during the first steps of dendritic differentiation.

PCs in organotypic cultures are well known to be resistant to classical transfection methods, and nonviral vectors such as the gene gun are not efficient enough to allow the transfection of a high proportion of PCs in slices (Lo et al., 1994; Wellmann et al., 1999; Murphy and Messer, 2001; Ghomari et al., 2002). In contrast, lentiviral vectors are capable of transducing cells that are dividing, growth arrested, or postmitotic (Poeschla et al., 1998) and have been shown previously to efficiently transduce Purkinje

cells *in vivo* (Alisky et al., 2000). In organotypic cultures, we demonstrate that HIV-derived lentiviral vectors transduce PCs with a very high efficiency and that the lentiviral infection itself does not affect PC survival or differentiation. Our results suggest that the use of recombinant lentiviral vectors is a powerful approach to perform gene transfer into PCs to study genetic regulation.

When homozygous, the murine *staggerer* mutation in the *Rora* gene leads to cerebellar atrophy attributable to the degeneration of most of the PCs (Sidman et al., 1962; Sotelo and Changeux, 1974; Herup, 1983; Vogel et al., 2000; Doulazmi et al., 2001). Furthermore, several histological studies of the *Rora*^{sg/sg} cerebellum show that the remaining PCs are immature and display atrophic dendrites, devoid of spines (Bradley and Berry, 1978; Sotelo, 1978, 1990), which suggests that ROR α is involved in the PC differentiation process. However, in which steps of differentiation ROR α acts remained unknown.

According to our results, ROR α does not appear to play a major role in the last phase of PC dendritic differentiation, because we did not detect an increase in the size of the dendritic tree of PCs in organotypic cultures when hROR α 1 is overexpressed in PCs that have already developed dendritic protrusions (stage III PCs). However, when ROR α is overexpressed as soon as P0, the late dendritic differentiation seems to be also accelerated. These data suggest that ROR α more likely plays a critical role in the earliest transitional stage from immature bipolar form to the stellate cell stage, and that this transition seems to be crucial for the progression of late dendritic development.

The vast majority of the studies on PC dendritic differentiation in organotypic cultures have focused on its last step, i.e., the dendritic growth occurring after the regression of the immature shape. Once PCs display a dendritic tree and have reached stage IV, it has been shown that dendritic growth is controlled by exogenous factors, such as electrical activity (Schilling et al., 1991) and trophic factors (Mount et al., 1995; Hirai and Launey, 2000; Swinny et al., 2004), or by PKC activity (Metzger and Kapfhammer, 2000). Hormones, such as estrogens (Shikimi et al., 2004), CRF (Swinny et al., 2004), or thyroid hormones (Heuer and Mason, 2003), also control dendritic growth. The development of mature dendrites and the dendritic monopolar disposition depends therefore mainly on exogenous factors, partly provided by the granule cells. That granule cell synaptic inputs are essential for the PC dendritic differentiation has also been demonstrated by analyzing PCs in agranular cerebellum, such as in *weaver* and *reeler* mice and in X-irradiated rat cerebellum (Mariani et al., 1977; Sotelo, 1978; Crepel et al., 1980b; Mariani and Changeux, 1980). In these cerebella, PCs display dendritic abnormalities, although dendrites are nevertheless studded with numerous spines.

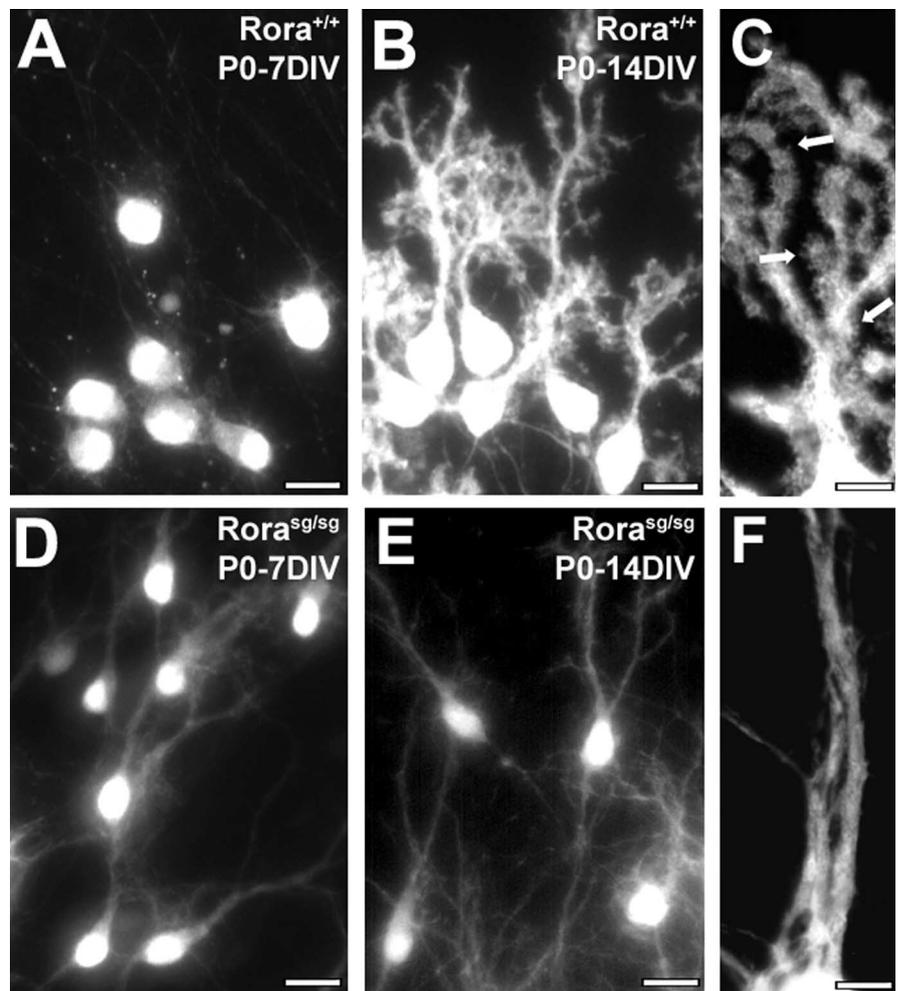


Figure 5. ROR α -deficient *staggerer* PCs fail to regress from their bipolar morphology. PCs in organotypic cultures from wild-type (A–C) or *staggerer* *Rora*^{sg/sg} (D–F) P0 mice, revealed by CaBP immunolabeling after 7 DIV (A, D) or 14 DIV (B, C, E, F). Wild-type PCs undergo normal differentiation: they are in stage II (PCs with regressive-atrophic dendrites) after 7 DIV and in stage IV (PCs with identified dendritic tree) after 14 DIV, with the emergence of dendrite spine-like structures (arrows in C). *Rora*^{sg/sg} PCs remain in the embryonic fusiform shape (stage I) after 7 DIV (D) and 14 DIV (E) and display smooth dendrites devoid of spines (F). Scale bars: A, B, D, E, 20 μ m (magnification, 20 \times); C, F, 5 μ m (magnification, 100 \times).

In contrast, in this study, we identify ROR α as a crucial factor controlling the regressive and remodeling step of dendritogenesis, a step that should not necessarily require cell–cell interactions. Previous studies (Sotelo, 1978; Baptista et al., 1994) have suggested that the first two stages of PC development are not dependent on cell–cell interactions. These authors thus proposed that the formation of early primitive dendritic processes, their withdrawal, and subsequent extension of perisomatic processes occur autonomously. Interestingly, unlike other nuclear receptors whose activity depends on binding of an exogenous ligand, ROR α is activated by abundant intracellular cholesterol (Kallen et al., 2002) and does not seem to need any exogenous factor to be activated (Atkins et al., 1999). Importantly, we also show that lentiviral-mediated hROR α 1 expression in *Rora*^{sg/sg} PCs enables them to pass through the PC stellate cell stage and thus restores a normal differentiation progression.

Our results obtained from organotypic cultures suggest that, *in vivo*, *Rora*^{sg/sg} PCs are unable to reach the stellate cell stage; they are arrested at the stage I but develop many processes that could form the immature and atrophic dendritic tree observed in the adult *Rora*^{sg/sg} cerebellum. In no case did *Rora*^{sg/sg} PCs develop

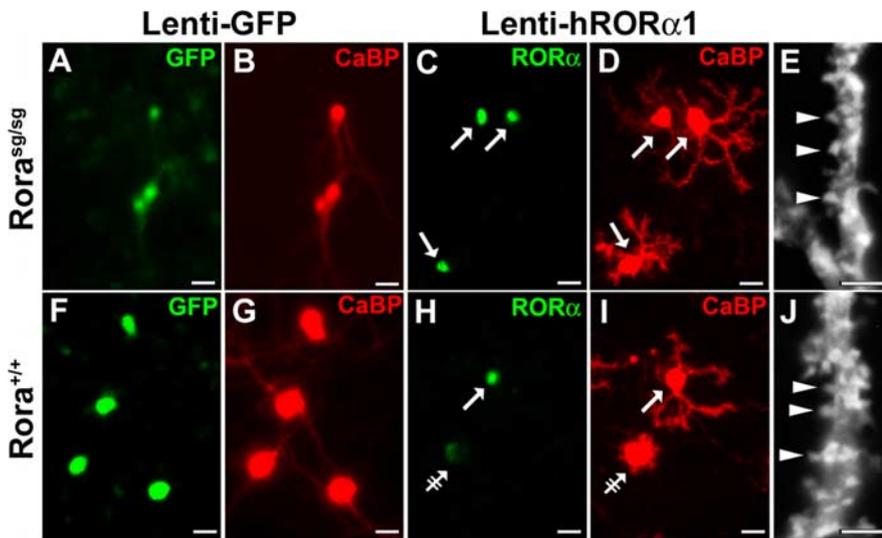


Figure 6. hROR α 1 replacement in *staggerer* PCs restores a normal dendritic differentiation. Organotypic cultures from *Rora*^{sg/sg} (A–E) or wild-type (F–J) P0 mice after 7 DIV, infected either with Lenti-GFP (A, B, F, G) or with Lenti-hROR α 1 (C–E, H–J). PCs are visualized with CaBP immunolabeling in red (B, D, G, I), whereas Lenti-GFP-transduced PCs are revealed by the green GFP expression (A, F), and hROR α 1-overexpressing PCs are identified by the high intensity of the ROR α immunolabeling in green (arrows in C, H) compared with the low intensity in nontransduced PCs with the endogenous ROR α expression level (double-crossed arrow in H). Control *Rora*^{sg/sg} PCs remain fusiform (A, B), whereas hROR α 1-overexpressing PCs present elaborate dendritic trees (C, D). Similar to Figure 3, control PCs with endogenous ROR α expression present a stellate form (F, G, and double-crossed arrow in H, I), whereas hROR α 1-overexpressing wild-type PCs have identified dendritic trees (arrow in H, I). Both hROR α 1-overexpressing *Rora*^{+/+} and *Rora*^{sg/sg} PCs develop spine-like structures (arrowheads in E, J). Scale bars: A–D, F–I, 20 μ m (magnification, 20 \times); E, J, 5 μ m (magnification, 100 \times).

tertiary dendritic spines. This is in agreement with what has been shown previously *in vivo* (Bradley and Berry, 1978; Sotelo, 1978, 1990).

Thus, ROR α seems to participate mainly in dendrite regression and remodeling (when PCs shorten their embryonic process to allow the emergence of an elaborated dendritic tree, with dendritic spines) rather than in dendritic growth. Regressive events that refine exuberant or inaccurate dendritic connections are critical in neuronal development and have been studied in insects. In insects, dendritic remodeling seems to be regulated by the steroid hormone 20-hydroxyecdysone (referred as ecdysone) in *Manduca sexta* or in *Drosophila melanogaster* (Weeks, 2003). Interestingly, ecdysone induces expression of the *Caenorhabditis elegans* CHR3 (Kostrouch et al., 1995), *Drosophila* DHR3 (Koelle et al., 1992), and *Manduca sexta* MHR3 (Palli et al., 1992) genes, which are homologs of the mammalian *Rora* gene. ROR α plays a role in the regressive and remodeling events of the normal dendritic differentiation of PCs, events that are comparable with those induced by the ecdysone pathway in insects. Ecdysone could thus control dendritic remodeling through the activation of the ROR α homologs in insects. Thyroid hormone [L-3,3',5-triiodothyronine hormone (TH)] is considered to be a functional equivalent of ecdysone in vertebrates. TH is important during embryonic and neonatal development of the CNS, including PC differentiation, and has been shown to regulate microtubule assembly and neuronal differentiation (for review, see Nunez et al., 1991; Oppenheimer and Schwartz, 1997), by controlling accumulation of microtubule-associated protein (MAP) such as MAP2 (Silva and Rudas, 1990; Haas et al., 2004). Evidence for cross-talk between ROR α and thyroid receptor pathways have been provided (Hamilton et al., 1996; Koibuchi and Chin, 1998; Kuno-Murata et al., 2000), suggesting that ROR α and TH could act on the PC differentiation by similar pathways.

Modifications in the dendritic architecture occur during CNS development but also in the mature nervous system to refine the function of neural circuits (Bottjer and Arnold, 1997; Cameron and Nunez-Abades, 2000; Cline, 2001). Interestingly, during aging, ROR α seems to control the maintenance of the elaborated dendritic tree because PC dendrites become atrophic in the cerebellum of aging heterozygous *staggerer* mice (Hadj-Sahraoui et al., 2001). ROR α thus appears to be a critical factor implicated in dendrite remodeling in PCs both during development and in the adult.

In conclusion, our study provides new insights into the genetic mechanisms that govern the control of the dendritic regression and identifies the transcription factor ROR α as a crucial nuclear factor controlling dendritic remodeling during development.

References

- Alisky JM, Hughes SM, Sauter SL, Jolly D, Dubensky Jr TW, Staber PD, Chiorini JA, Davidson BL (2000) Transduction of murine cerebellar neurons with recombinant FIV and AAV5 vectors. *NeuroReport* 11:2669–2673.
- Armengol JA, Sotelo C (1991) Early dendritic development of Purkinje cells in the rat cerebellum. A light and electron microscopic study using axonal tracing in “in vitro” slices. *Brain Res Dev Brain Res* 64:95–114.
- Atkins GB, Hu X, Guenther MG, Rachez C, Freedman LP, Lazar MA (1999) Coactivators for the orphan nuclear receptor ROR α . *Mol Endocrinol* 13:1550–1557.
- Baptista CA, Hatten ME, Blazewski R, Mason CA (1994) Cell-cell interactions influence survival and differentiation of purified Purkinje cells in vitro. *Neuron* 12:243–260.
- Bottjer SW, Arnold AP (1997) Developmental plasticity in neural circuits for a learned behavior. *Annu Rev Neurosci* 20:459–481.
- Bradley P, Berry M (1978) The Purkinje cell dendritic tree in mutant mouse cerebellum. A quantitative Golgi study of Weaver and *Staggerer* mice. *Brain Res* 142:135–141.
- Cameron WE, Nunez-Abades PA (2000) Physiological changes accompanying anatomical remodeling of mammalian motoneurons during postnatal development. *Brain Res Bull* 53:523–527.
- Cline HT (2001) Dendritic arbor development and synaptogenesis. *Curr Opin Neurobiol* 11:118–126.
- Crepel F, Delhaye-Bouchaud N, Guastavino JM, Sampaio I (1980a) Multiple innervation of cerebellar Purkinje cells by climbing fibres in *staggerer* mutant mouse. *Nature* 283:483–484.
- Crepel F, Delhaye-Bouchaud N, Dupont JL, Sotelo C (1980b) Dendritic and axonic fields of Purkinje cells in developing and x-irradiated rat cerebellum. A comparative study using intracellular staining with horseradish peroxidase. *Neuroscience* 5:333–347.
- Doulazmi M, Frederic F, Capone F, Becker-Andre M, Delhaye-Bouchaud N, Mariani J (2001) A comparative study of Purkinje cells in two ROR α gene mutant mice: *staggerer* and ROR α (–/–). *Brain Res Dev Brain Res* 127:165–174.
- Ghoumari AM, Wehrle R, De Zeeuw CI, Sotelo C, Dusart I (2002) Inhibition of protein kinase C prevents Purkinje cell death but does not affect axonal regeneration. *J Neurosci* 22:3531–3542.
- Gold DA, Baek SH, Schork NJ, Rose DW, Larsen DD, Sachs BD, Rosenfeld MG, Hamilton BA (2003) ROR α coordinates reciprocal signaling in cerebellar development through Sonic hedgehog and calcium-dependent pathways. *Neuron* 40:1119–1131.
- Haas MJ, Mreyoud A, Fishman M, Mooradian AD (2004) Microarray anal-

- ysis of thyroid hormone-induced changes in mRNA expression in the adult rat brain. *Neurosci Lett* 365:14–18.
- Hadj-Sahraoui N, Frederic F, Zanjani H, Delhaye-Bouchaud N, Herrup K, Mariani J (2001) Progressive atrophy of cerebellar Purkinje cell dendrites during aging of the heterozygous staggerer mouse (Rora(+/-sg)). *Brain Res Dev Brain Res* 126:201–209.
- Hamilton BA, Frankel WN, Kerrebrock AW, Hawkins TL, FitzHugh W, Kusumi K, Russell LB, Mueller KL, van Berkel V, Birren BW, Kruglyak L, Lander ES (1996) Disruption of the nuclear hormone receptor RORalpha in staggerer mice. *Nature* 379:736–739.
- Hendelman WJ, Aggerwal AS (1980) The Purkinje neuron. I. A Golgi study of its development in the mouse and in culture. *J Comp Neurol* 193:1063–1079.
- Herrup K (1983) Role of staggerer gene in determining cell number in cerebellar cortex. I. Granule cell death is an indirect consequence of staggerer gene action. *Brain Res* 313:267–274.
- Heuer H, Mason CA (2003) Thyroid hormone induces cerebellar Purkinje cell dendritic development via the thyroid hormone receptor alpha. *J Neurosci* 23:10604–10612.
- Hirai H, Launey T (2000) The regulatory connection between the activity of granule cell NMDA receptors and dendritic differentiation of cerebellar Purkinje cells. *J Neurosci* 20:5217–5224.
- Kallen JA, Schlaeppi JM, Bitsch F, Geisse S, Geiser M, Delhon I, Fournier B (2002) X-Ray Structure of the hRORalpha LBD at 1.63 Å: structural and functional data that cholesterol or a cholesterol derivative is the natural ligand of RORalpha. *Structure* 10:1697–1707.
- Koelle MR, Segraves WA, Hogness DS (1992) DHR3: a *Drosophila* steroid receptor homolog. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:6167–6171.
- Koibuchi N, Chin WW (1998) ROR alpha gene expression in the perinatal rat cerebellum: ontogeny and thyroid hormone regulation. *Endocrinology* 139:2335–2341.
- Kostrouch Z, Kostrouchova M, Rall JE (1995) Steroid/thyroid hormone receptor genes in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:156–159.
- Kuno-Murata M, Koibuchi N, Fukuda H, Murata M, Chin WW (2000) Augmentation of thyroid hormone receptor-mediated transcription by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase type IV. *Endocrinology* 141:2275–2278.
- Lo DC, McAllister AK, Katz LC (1994) Neuronal transfection in brain slices using particle-mediated gene transfer. *Neuron* 13:1263–1268.
- Mariani J, Changeux JP (1980) Multiple innervation of Purkinje cells by climbing fibers in the cerebellum of the adult staggerer mutant mouse. *J Neurobiol* 11:41–50.
- Mariani J, Crepel F, Mikoshiba K, Changeux JP, Sotelo C (1977) Anatomical, physiological and biochemical studies of the cerebellum from Reeler mutant mouse. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 281:1–28.
- Messer A, Plummer-Siegarth J, Eisenberg B (1990) Staggerer mutant mouse Purkinje cells do not contain detectable calmodulin mRNA. *J Neurochem* 55:293–302.
- Metzger F, Kapfhammer JP (2000) Protein kinase C activity modulates dendritic differentiation of rat Purkinje cells in cerebellar slice cultures. *Eur J Neurosci* 12:1993–2005.
- Mount HT, Dean DO, Alberch J, Dreyfus CF, Black IB (1995) Glial cell line-derived neurotrophic factor promotes the survival and morphologic differentiation of Purkinje cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:9092–9096.
- Murphy RC, Messer A (2001) Gene transfer methods for CNS organotypic cultures: a comparison of three nonviral methods. *Mol Ther* 3:113–121.
- Nunez J, Couchie D, Aniello F, Bridoux AM (1991) Regulation by thyroid hormone of microtubule assembly and neuronal differentiation. *Neurochem Res* 16:975–982.
- Oppenheimer JH, Schwartz HL (1997) Molecular basis of thyroid hormone-dependent brain development. *Endocr Rev* 18:462–475.
- Palli SR, Hiruma K, Riddiford LM (1992) An ecdysteroid-inducible *Manduca* gene similar to the *Drosophila* DHR3 gene, a member of the steroid hormone receptor superfamily. *Dev Biol* 150:306–318.
- Poeschla EM, Wong-Staal F, Looney DJ (1998) Efficient transduction of nondividing human cells by feline immunodeficiency virus lentiviral vectors. *Nat Med* 4:354–357.
- Ramón y Cajal S (1911) *Histologie du Système Nerveux de l'Homme et des Vertébrés*. Paris: Maloine Edition.
- Schilling K, Dickinson MH, Connor JA, Morgan JI (1991) Electrical activity in cerebellar cultures determines Purkinje cell dendritic growth patterns. *Neuron* 7:891–902.
- Shikimi H, Sakamoto H, Mezaki Y, Ukena K, Tsutsui K (2004) Dendritic growth in response to environmental estrogens in the developing Purkinje cell in rats. *Neurosci Lett* 364:114–118.
- Shirley LT, Messer A (2004) Early postnatal Purkinje cells from staggerer mice undergo aberrant development in vitro with characteristic morphologic and gene expression abnormalities. *Brain Res Dev Brain Res* 152:153–157.
- Sidman RL, Lane PV, Dickie MM (1962) staggerer, a new mutation in the mouse affecting the cerebellum. *Science* 136:610–612.
- Silva JE, Rudas P (1990) Effects of congenital hypothyroidism on microtubule-associated protein-2 expression in the cerebellum of the rat. *Endocrinology* 126:1276–1282.
- Sirven A, Ravet E, Charneau P, Zennou V, Coulombel L, Guetard D, Pflumio F, Dubart-Kupferschmitt A (2001) Enhanced transgene expression in cord blood CD34(+) derived hematopoietic cells, including developing T cells and NOD/SCID mouse repopulating cells, following transduction with modified trip lentiviral vectors. *Mol Ther* 3:438–448.
- Sotelo C (1978) Purkinje cell ontogeny: formation and maintenance of spines. *Prog Brain Res* 48:149–170.
- Sotelo C (1990) Cerebellar synaptogenesis: what we can learn from mutant mice. *J Exp Biol* 153:225–249.
- Sotelo C, Changeux JP (1974) Transsynaptic degeneration “en cascade” in the cerebellar cortex of staggerer mutant mice. *Brain Res* 67:519–526.
- Steinmayr M, Andre E, Conquet F, Rondi-Reig I, Delhaye-Bouchaud N, Auclair N, Daniel H, Crepel F, Mariani J, Sotelo C, Becker-Andre M (1998) staggerer phenotype in retinoid-related orphan receptor alpha-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:3960–3965.
- Swiny JD, Metzger F, Gounko NV, Gramsbergen A, van der Want JJ (2004) Corticotropin-releasing factor and urocortin differentially modulate rat Purkinje cell dendritic outgrowth and differentiation in vitro. *Eur J Neurosci* 19:1749–1758.
- Vogel MW, Sinclair M, Qiu D, Fan H (2000) Purkinje cell fate in staggerer mutants: agenesis versus cell death. *J Neurobiol* 42:323–337.
- Weeks JC (2003) Thinking globally, acting locally: steroid hormone regulation of the dendritic architecture, synaptic connectivity and death of an individual neuron. *Prog Neurobiol* 70:421–442.
- Wellmann H, Kaltschmidt B, Kaltschmidt C (1999) Optimized protocol for biolistic transfection of brain slices and dissociated cultured neurons with a hand-held gene gun. *J Neurosci Methods* 92:55–64.
- Zanjani HS, Mariani J, Herrup K (1990) Cell loss in the inferior olive of the staggerer mutant mouse is an indirect effect of the gene. *J Neurogenet* 6:229–241.
- Zennou V, Petit C, Guetard D, Nerhass U, Montagnier L, Charneau P (2000) HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap. *Cell* 101:173–185.
- Zennou V, Serguera C, Sarkis C, Colin P, Perret E, Mallet J, Charneau P (2001) The HIV-1 DNA flap stimulates HIV vector-mediated cell transduction in the brain. *Nat Biotechnol* 19:446–450.
- Zufferey R, Nagy D, Mandel RJ, Naldini L, Trono D (1997) Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat Biotechnol* 15:871–875.
- Zufferey R, Donello JE, Trono D, Hope TJ (1999) Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *J Virol* 73:2886–2892.

II. Rôle de ROR α dans la différenciation neuronale :
2. Article III - L'action de la T₃ dans la différenciation précoce des cellules de Purkinje implique ROR α

II.2. L'action de l'hormone thyroïdienne (T₃) dans la différenciation précoce des cellules de Purkinje implique ROR α .

Article III: Thyroid hormone (T₃)-induced early PC differentiation involves ROR α

Fatiha Boukhtouche, Bernard Brugg, Rosine Wehrlé, Isabelle Dusart & Jean Mariani.

Article en préparation.

Le rôle des hormones thyroïdiennes (TH/Thyroid Hormones) dans le développement du système nerveux est bien connu. Une déficience congénitale en hormone thyroïdienne conduit à des anomalies développementales, et au niveau cérébelleux, elle conduit à un retard de développement qui résulte en une atrophie du cervelet et à des anomalies de différenciation des cellules de Purkinje. Au cours du développement du cervelet, ces hormones, via la forme active L-3,3',5-triiodothyronine (T₃), contrôlent - entre autres - la migration des neurones et la différenciation de l'arbre dendritique des cellules de Purkinje. Cependant, le rôle de la TH dans la différenciation précoce des cellules des Purkinje est peu décrit.

Dans cette étude, nous avons testé le rôle de la T₃ dans le développement dendritique précoce des cellules de Purkinje. Pour cela, nous avons maintenu des cultures organotypiques réalisées à P0 pendant 7 jours, dans un milieu de culture défini, sans sérum. Nous avons quantifié la progression de la différenciation des cultures soumises à des concentrations croissantes de T₃, en classifiant les cellules de Purkinje selon les stades décrits dans l'article II.

Nos résultats suggèrent que la T₃ accélère les étapes précoces de la différenciation des cellules de Purkinje. Nous avons montré dans la précédente étude (voir §II.1) que ROR α contrôle cette étape précoce. Afin de déterminer si les effets de la T₃ pouvaient être médiés par ROR α , nous avons suivi l'expression de ROR α en réponse à un traitement à la T₃. Nous

II. Rôle de ROR α dans la différenciation neuronale :

2. Article III - L'action de la T₃ dans la différenciation précoce des cellules de Purkinje implique ROR α

montrons que l'expression de ROR α est augmentée au niveau ARNm et protéique. De plus, l'ajout de T₃ dans des cultures organotypiques issues de cervelet de souris Rora^{sg/sg} n'a aucun effet sur la différenciation des cellules de Purkinje. Ces résultats suggèrent que les effets de la T₃ sur la différenciation précoce des cellules de Purkinje sont médiés par ROR α . Cette étude montre donc une interaction forte entre l'hormone thyroïdienne et ROR α au cours du développement du cervelet pendant la différenciation précoce des cellules de Purkinje.

II. Rôle de ROR α dans la différenciation neuronale :
2. Article III - L'action de la T₃ dans la différenciation précoce des cellules de Purkinje
implique ROR α

**Thyroid hormone (T₃)-induced early PC differentiation
involves ROR α**

Fatiha Boukhtouche, Bernard Brugg, Rosine Wehrlé, Isabelle Dusart & Jean Mariani

Université Pierre et Marie Curie-Paris6, UMR 7102 - Neurobiologie des Processus Adaptatifs
(NPA) ; CNRS, UMR 7102 – NPA, Paris, F-75005.

II. Rôle de ROR α dans la différenciation neuronale :

2. Article III - L'action de la T₃ dans la différenciation précoce des cellules de Purkinje implique ROR α

Abstract

Thyroid hormone (TH), through its active form T₃, controls critical aspects of cerebellar development, such as migration of postmitotic neurons and terminal dendritic differentiation of Purkinje cells (PCs). The effects of T₃ on the early dendritic differentiation are poorly understood. In this study, we have analyzed the influence of T₃ on the progression of the early steps of PC dendritic differentiation in P0 organotypic cerebellar cultures, which include regression of immature neuritic processes to the extension of one to three perisomatic protrusions before the growth of the ultimate dendritic tree. We also studied the involvement of ROR α , a nuclear receptor controlling early PC dendritic differentiation. We show that treatment of slices cultivated in serum-free condition with T₃ leads to an accelerated progression of early steps of dendritic differentiation, together with an increased expression of ROR α in both PCs and interneurons, at both mRNA and protein levels. In addition, ROR α seems to be required for this process, since T₃ failed to promote the early dendritic differentiation of *staggerer* ROR α -deficient PCs. This study suggests a ROR α -mediated T₃ action on the early PC dendritic differentiation.

II. Rôle de ROR α dans la différenciation neuronale :

2. Article III - L'action de la T₃ dans la différenciation précoce des cellules de Purkinje implique ROR α

Introduction

The thyroid hormone (TH) L-3,3',5-triiodothyronine (T₃) is essential for normal CNS development (Oppenheimer and Schwartz, 1997), as T₃ regulates those processes associated with terminal brain differentiation such as neuronal migration, axonal and dendritic growth, synaptogenesis, and myelination (Anderson, 2001). In particular, TH plays an important role in cerebellar neurogenesis (Nicholson and Altman, 1972a, b, c), whose development is mainly postnatal. As a consequence, perinatal hypothyroidism affects the morphogenesis of cerebellar neurons, in particular the dendritic arborization of PCs (which display a striking reduction in the growth and branching of dendritic arborisation (Vincent et al., 1982)) and delays synaptic formation between PC and granular cells (Nicholson and Altman, 1972a, b, c; Crepel, 1974). Recently, T₃ has been shown to directly affect late PC dendritic growth through activation of the thyroid nuclear receptor TR α 1 (Heuer and Mason, 2003).

Shortly after birth, cerebellar PCs display a bipolar shape reminiscent of their migratory morphology. These immature PCs then follow a process of dendritic regression, prior to extending apical dendrites from which the ultimate and characteristic dendritic tree will arise. We have recently demonstrated that the nuclear receptor ROR α controls the early dendritic differentiation steps, particularly the regressive phase of this process (Boukhtouche et al., 2006a). ROR α deletion in the spontaneous *staggerer* (*sg*) mutant leads to cerebellar development defects, including a dramatic PC and granular cell loss (Sidman et al., 1962; Hamilton et al., 1996; Doulazmi et al., 2001). By combination of promoter usage and alternative splicing, the *Rora* gene gives rise to two isoforms in the mouse (ROR α 1 and ROR α 4) which differ only in their N-terminal modulator region (Becker-Andre et al., 1993; Carlberg et al., 1994; Giguere et al., 1994).

Interestingly, a cross-talk between TH pathway and ROR α has been shown. In hypothyroid rats, daily T₄ replacement accelerates the increase in ROR α mRNA content in the developing cerebellum, most obviously at P15 (Koibuchi and Chin, 1998). In *Rora*^{sg/sg} mutant mouse, despite both normal TR expression (Hamilton et al., 1996) and normal serum TH levels (Messer and Hatch, 1984), *staggerer* neurons seem to be unresponsive to TH treatment (Messer, 1988).

II. Rôle de ROR α dans la différenciation neuronale :

2. Article III - L'action de la T₃ dans la différenciation précoce des cellules de Purkinje implique ROR α

Despite the detailed description of cerebellar abnormalities consecutive to hypothyroidism, the molecular mechanisms underlying T₃-induced PC morphogenesis remain poorly understood. Moreover, most of the studies concern the role of TH in the late PC dendritic growth which involves cross-talk and synaptogenesis with granular cells, but little is known about TH effect on the early dendritic differentiation.

In this study, we aimed at determining the role of TH in early PC dendritic differentiation, and we studied the implication of ROR α in this process. Using organotypic cultures, we have thus studied the PC differentiation progression in the presence or not of T₃ and we observed an acceleration of the progression of the differentiation when T₃ was added on P0 cerebellar slices maintained 7 days in vitro (DIV). We further suggest that this accelerated differentiation is dependent of a T₃-induced increase in the ROR α expression.

II. Rôle de ROR α dans la différenciation neuronale :

2. Article III - L'action de la T₃ dans la différenciation précoce des cellules de Purkinje implique ROR α

Materials and Methods

Animals

Animal housing and all procedures were carried out in accordance with the guidelines of the French Ministry of Agriculture and the European Community.

Swiss mice were obtained from Janvier (Le Genest-St-Isle, France).

The *staggerer Rora^{sg/sg}* mutant mice were maintained on a C57BL/6J genetic background in our colony. *Rora^{sg/sg}* and their *Rora^{+/+}* littermates were obtained by intercrossing fertile heterozygous *Rora^{+/sg}* animals, and were genotyped by PCR, as previously described (Boukhtouche et al., 2006a).

Slice cultures

Swiss mice at postnatal day 0 (P0) were used. Organotypic cultures of cerebellum were prepared as described previously (Ghoumari et al., 2002). Briefly, after decapitation, brains were dissected out into cold Gey's balanced salt solution (GBSS, Sigma) supplemented with 5 mg/mL glucose, and the meninges were removed. Parasagittal cerebellar slices (350 μ m thick) were cut on a McIlwain tissue chopper and transferred onto 30 mm Millipore membrane culture inserts with a 0.4 μ m pore size (Millicell CM, Millipore). Slices were maintained in culture in six-well plates containing 1mL/well of medium containing basal medium with Earle's salts (BME), supplemented with Sigma I-1884 supplement (1:100 dilution, resulting in final concentrations of 5 μ g/mL insulin, 5 μ g/ml transferrin, and 5 ng/ml sodium selenite), 0.5 μ g/mL BSA (Sigma), 4mM L-glutamine (Invitrogen, GIBCO), 5 mg/mL glucose, with or without T₃ at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. The medium was replaced every 2 days (after 2, 4 and 6 days in culture).

Mice obtained from *Rora^{+/sg}* intercrosses were also used in this study. In these litters *Rora^{+/+}*, *Rora^{+/sg}* and *Rora^{sg/sg}* mice could be generated. For each animal, slices of each cerebellum were divided between two Millicells: half of cerebellar slices served as control and no T₃ was added, and the other half received T₃ (30nM), in order to compare control (0nM T₃) versus T₃-treated slices (30nM T₃) from the same animals. The genotype was determined *a posteriori* by PCR on tail biopsy, in blind studies.

II. Rôle de ROR α dans la différenciation neuronale :

2. Article III - L'action de la T₃ dans la différenciation précoce des cellules de Purkinje implique ROR α

Antibodies and staining procedures

Immunostaining of calbindin (CaBP), parvalbumin or ROR α was performed as described previously (Boukhtouche et al., 2006a). Briefly, cerebellar slices were fixed in 4% paraformaldehyde, and then incubated for 1h in PBS containing 0.25% Triton X-100, 0.2% gelatin, 0.1% sodium azide (PBSGTA) and 0.1M lysine. Rabbit polyclonal anti-CaBP antibody (1:5000 dilution; Swant) to visualize PCs or Rabbit polyclonal anti-parvalbumin (1:5000 dilution; Swant) to visualize both PCs and interneurons, and goat polyclonal anti-ROR α 1 (sc-6062; 1:4000 dilution; Santa-Cruz) in PBSGTA were applied overnight. At this dilution, the intensity of ROR α labeling was correlated to the ROR α expression level (Boukhtouche et al., 2006a). Specific labelling was detected with Cy3-conjugated donkey anti-rabbit (1:500 dilution; Jackson Immunoresearch) and FITC-conjugated donkey anti-goat (1:2000 dilution; Jackson Immunoresearch). The slices were analyzed with an inverted microscope (Nikon Eclipse TE 300). Immunofluorescence images were captured at 400x magnification using a Qimaging Retiga 1300 camera, and analyzed using Image-Pro Plus 4.1 software (Media Cybernetics). For ROR α fluorescence intensity measurements, fluorescence density was measured in the nucleus of PC (visualized by CaBP immunolabelling), using MetaMorph software.

Classification of PC differentiation stages

Classification of PCs was assessed after CaBP immunostaining, as previously described (Boukhtouche et al., 2006a). Briefly, fusiform PCs with a bipolar shape, reminiscent of embryonic migratory PCs, are defined as stage I and correspond to both "simple" and "complex"-fusiform stages, observed from E16 to P4 *in vivo* (Armengol and Sotelo, 1991). Stage II is comprised of PCs with short processes all around the soma. This "stellate" stage includes both "regressive-atrophic dendrites" and "stellate cell" stages described previously, from P2 to P6 *in vivo*. PCs with one to three perisomatic protrusions are defined as stage III. They correspond to PCs around P5-P10 *in vivo*. Finally, PCs with one or more identified dendritic trees (defined as primary dendrites giving rise to additional side branches) are classified as stage IV. Images were taken from all slices, corresponding to at least 200 PCs in each experiment. Quantification was performed on three independent experiments.

II. Rôle de ROR α dans la différenciation neuronale :

2. Article III - L'action de la T₃ dans la différenciation précoce des cellules de Purkinje implique ROR α

Western-blot analysis.

Cultured slices were lysed in solubilization buffer (500 mM NaCl, 1mM MgCl₂, 2mM EGTA, 50 mM Bicine; pH 9.0, 50mM NaF, 5 μ M ZnCl₂, 100 μ M Na₃VO₄, 1mM dithiothreitol, 5nM okadaic acid, 2.5 μ g/mL aprotinin, 3.6 μ M pepstatin, 0.5 μ M phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.5mM benzamidine, 5.3 μ M leupeptin) and dounced at 4°C. Insoluble materials were removed by centrifugation (13,000 g for 20 minutes at 4°C), supernatants were isolated and the samples were stored at -80°C. Proteins were dosed with the DC protein assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Cell-extracts containing equivalent amounts of protein were boiled for 5 minutes in sample loading buffer. After a 10% SDS-PAGE, proteins were transferred to a polyvinylidene difluoride membrane (ICN Biochemicals, Costa Mesa, CA USA). Non-specific sites were blocked with 5% skimmed dried milk for 2 hours. Blots were then incubated overnight at 4°C with primary antibodies against ROR α (Santa Cruz, 1/2000) and α -tubulin (Sigma/10000) in 5% skimmed dried milk. They were then incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies in 5% skimmed dried milk for 1 hour. The revelation was processed with enhanced chemoluminescence substrate (Amersham, UK). Quantification was processed using the Densylab software (Microvision Instruments).

Real Time RT-PCR.

Total RNA from cerebellar slices from three animals were prepared according to the manufacturer's instructions using the RNeasy kit (Qiagen) and cDNAs were synthesized from 1 μ g of RNA (Promega) and AMV reverse transcriptase, as per manufacturer's instructions. RT-PCR was performed using the ABsolute™ QPCR SYBR® Green Mixes Kit (Abgene), as per manufacturer's instructions. Reactions were performed in 25 μ l of total volume containing ABsolute™ QPCR SYBR® Green Mix with 8 ng of the first-strand cDNA and 300 nM of primers. Following primers were used: *Rora1* sense 5'-AGGCAGAGCTATGCGAGC-3' and antisense 5'-TCAAACAGTTCTTCTGACGAGG-3'; *Rora4* sense 5'-GTCACATGGAGCCTCTTATGG-3' and antisense 5'-TCAAACAGTTCTTCTGACGAGG-3'; *I8s* sense 5'-GGGAGCCTGAGAAACGGC-3' and antisense 5'-GGGTCGGAGTGGGTAATTT-3'. Amplification was performed on an iCycler (Bio-Rad) according to the manufacturer's instructions and cycle parameters were: 50°C (2 min) and 95°C (10 min), followed by 40 cycles of 95°C (15 s), 60°C (30 s) and 72°C (30 s). For

II. Rôle de ROR α dans la différenciation neuronale :

2. Article III - L'action de la T₃ dans la différenciation précoce des cellules de Purkinje implique ROR α

expression quantification, a comparative C_T method was used (Aarskog and Vedeler, 2000; Pfaffl, 2001). The ΔC_T -value was obtained by subtracting the C_T -value of the *18S* (reference) from the C_T -value of the gene of interest, where in each case the mean value of three reactions was used. For each gene, the fold change was calculated according to the formula $2^{-(\Delta\Delta C_T)}$, where $\Delta\Delta C_T$ was the difference between the ΔC_T T₃-treated cultures and the ΔC_T in untreated cultures as a calibrator value. To distinguish specific amplicons from non-specific amplifications, a dissociation curve was generated for each transcript. Quantification was performed on three independent experiments.

Statistical analysis

Independent experiments were performed with 10 to 12 cerebellar slices per sample and repeated three times using matched controls. For PC stage quantification, at least 200 PCs were analyzed in each sample. For the ROR α RNA level quantification by real-time PCR, all slices of 3 animals were used in each experiment. Results are expressed in figures as mean \pm SD. The statistical significance of differences between control and T₃-treated slices was assessed by a student's *t*-test using Statview software (SAS Institute Inc).

II. Rôle de ROR α dans la différenciation neuronale :

2. Article III - L'action de la T₃ dans la différenciation précoce des cellules de Purkinje implique ROR α

Results

T₃ supply accelerates the first steps of early dendritic differentiation of PCs.

At birth, *in vivo*, most murine PCs are fusiform (bipolar shape; stage I) (data not shown), as described for rats (Armengol and Sotelo, 1991). When cultured at P0 and kept in organotypic cultures, from their immature stage I, PCs retract their primitive dendrites (stage II), then elongate numerous perisomatic protrusions (stage III) and finally, they develop their ultimate dendritic trees (stage IV) (Boukhtouche et al., 2006a).

In organotypic cultures, after 7 days in a serum-containing medium, PCs were mostly in the stage II, whereas almost no stage III were observed. In order to explore the involvement of T₃ in the early dendritic differentiation, (i.e. before the extension of the ultimate dendritic tree in stage IV), cultures from P0 animals were prepared and kept 7 DIV under serum-free conditions, with or without addition of T₃ at different concentrations. Cultures were then fixed and immunolabeled with an anti-CaBP antibody to visualize PCs.

In slices cultivated without T₃, most PCs (76%) from P0 slices displayed "regressive-atrophic" dendrites after 7DIV and were thus in the stellate stage II (figure 1A, B). Adding T₃ at a concentration of 3nM did not dramatically modify the repartition of PC classes (figure 1C, D). In contrast, supply of 30nM of T₃ led to a significant acceleration of the early dendritic differentiation since we observed that 27% of PCs were in stage II, 39% displayed one to three perisomatic protrusions and were thus classified as stage III PCs, and 34% displayed an identified dendritic tree (stage IV; figure 1E, F). Increased concentration of T₃ (100nM) led to an acceleration of differentiation compared to 0nM and 3nM of T₃, but the effect was less important than 30nM T₃ treatment (figure 1G, H). In the following experiments, we have thus used the 30nM concentration to assess the effects of T₃ since this concentration is the most efficient in our cultures conditions.

From these experiments, we can conclude that T₃ promotes the first dendritic differentiation steps of PCs in organotypic cultures.

T₃ leads to an increased amount of ROR α protein level in PCs and interneurons.

To determine whether the T₃-induced dendritic differentiation acceleration involves ROR α , we assessed the ROR α expression in slices in response to T₃ treatment.

II. Rôle de ROR α dans la différenciation neuronale :

2. Article III - L'action de la T₃ dans la différenciation précoce des cellules de Purkinje implique ROR α

Western blots of P0-7DIV cerebellar slices were performed with antibodies directed against the C-terminus end of ROR α , which can detect both ROR α 1 and ROR α 4 isoforms, since isoforms differ only by their N-terminal domain (Becker-Andre et al., 1993). We detected an increase in the amount of ROR α 1 protein in slices treated with 30nM of T₃ (figure 2A). In contrast, we detected no difference in the amount of ROR α 4 proteins (figure 2A).

In the cerebellum, ROR α is known to be expressed only in PCs and interneurons (Ino, 2004). In order to determine in which kind of cells the upregulation occurred, we performed immunofluorescence of ROR α in slices. Only PCs in the cerebellum express CaBP, we thus used CaBP as a PC specific marker. To detect interneurons, we used parvalbumin immunolabelling. Both interneurons and PCs express parvalbumin; the distinction between these two cell-types has been assessed on the basis of their morphology and size, since interneurons somas are smaller than PC ones.

In untreated P0 slices, after 7 DIV, ROR α expression was only detected in CaBP-positive cells, thus only in PCs (figure 2B). Interestingly, following T₃ treatment, ROR α labelling was observed in PCs and also in some CaBP-negative cells (data not shown). The CaBP-negative cells which express ROR α were shown to express parvalbumin, and identified as interneurons (figure 2C). Using antibodies against Pax6 and alpha6, GFAP and O4 immunolabellings, we observed that neither granular cells, nor astrocytes, nor oligodendrocytes precursors respectively did express ROR α (data not shown). T₃ treatment thus led to an increased expression of ROR α in parvalbumin-positive interneurons. To assess whether T₃ led to an increased expression in PCs, we quantified the fluorescence density of ROR α labelling within the nucleus of PCs. We observed a significant increase in the fluorescence density in T₃-treated slices compared to control T₃-untreated slices (figure 2D).

These results suggest that T₃ induced an increased ROR α protein level in Purkinje cells and in interneurons.

T₃ supply leads to an increased ROR α expression at the mRNA level.

To determine whether the increase in ROR α protein in T₃-treated cerebellar slices is the consequence of an increased expression of the *Rora* gene, and not a stabilization of the protein, we have analyzed by real time RT-PCR the expression of the *Rora* isoforms at the mRNA level in T₃-treated slices compared to untreated slices. Our results reveal that mRNA

II. Rôle de ROR α dans la différenciation neuronale :

2. Article III - L'action de la T₃ dans la différenciation précoce des cellules de Purkinje implique ROR α

levels of both *Roral* and *Rora4* isoforms were stable in cultures made at P0 and kept 6h, 24h and 7DIV in culture without T₃ (figure 3A, B). In contrast, we observed a specific increase in the *Roral* mRNA level after 6h and 24h of T₃ treatment (6.3- and 5.8-fold increase respectively). A 3.7-fold increase was still observed after 7 DIV. *Rora4* mRNA were also increased in slices after 6h and 24h of T₃ treatment, but to a lesser extent (1.8- and 1.9-fold increase respectively). This increase was transient, as the *Rora4* mRNA level was similar to untreated slices after 7DIV. These results show that T₃ leads to an increased expression of the *Rora* gene, particularly the *Roral* isoform.

T₃-induced differentiation involves ROR α .

From the above mentioned experiments, we show that T₃ promotes dendritic differentiation (figure 1) and leads to an increased expression of ROR α 1 (figures 2 and 3). We have recently shown that ROR α is a crucial factor controlling the early steps of PC differentiation, and *staggerer* ROR α -deficient Purkinje cells do not progress beyond the early migratory morphology (Boukhtouche et al., 2006a).

To determine whether ROR α could be involved in the T₃-induced PC dendritic differentiation, we followed the progression of the differentiation of PCs from *staggerer* (*Rora*^{sg/sg}) and corresponding control *Rora*^{+/+} cerebellar slices treated or not with T₃.

As previously observed in serum-containing cultures, PCs from *Rora*^{sg/sg} cultured in serum-free medium display the embryonic bipolar shape (stage I) after 7 DIV (figure 4B), whereas most PCs in control *Rora*^{+/+} cultures displayed "regressive-atrophic" dendrites (stage II; figure 4A). In the presence of T₃ 30nM, stage II, III and IV PCs were found (figure 4C) with the same proportions as described above in figure 1. In contrast, PCs from *Rora*^{sg/sg} animals still display embryonic bipolar shape (figure 4D).

The absence of ROR α thus prevents the T₃-induced accelerated progression of dendritic differentiation of immature bipolar P0 PCs. This experiment suggests that ROR α is required in the T₃-induced differentiation promoting process.

II. Rôle de ROR α dans la différenciation neuronale :

2. Article III - L'action de la T₃ dans la différenciation précoce des cellules de Purkinje implique ROR α

Discussion

Our results strongly suggest for the first time that T₃ promotes the early steps of PC dendritic differentiation. Addition of T₃ to the serum-free medium of P0 cerebellar slices resulted in acceleration of the early steps of dendritic differentiation. This accelerated progression of the differentiation was accompanied with an increased expression of the gene encoding the nuclear receptor ROR α , observed at both mRNA and protein levels. Last, ROR α expression might be required for the T₃-induced differentiation, as T₃ treatment did not promote differentiation of *Rora*^{sg/sg} PCs, in accordance with previous studies which suggest an unresponsiveness of *Rora*^{sg/sg} mutants to TH (Messer, 1988).

T₃ promotes the early PC dendritic differentiation.

The role of thyroid hormone in mammalian brain and particularly during the cerebellar development is well documented (for review, see (Oppenheimer and Schwartz, 1997; Thompson and Potter, 2000)). Congenital hypothyroidism in humans leads to a syndrome termed cretinism (Porterfield and Hendrich, 1993) of which apparent symptoms include ataxia and poor motor skill, indicating cerebellar defects. In Purkinje cells, TH is known to strongly promote the differentiation of the elaborate dendritic tree and synapse formation. In contrast, little is known about its role in the events preceding the elaboration of the dendritic tree, in particular the steps of neuritic regression and early extension of perisomatic protrusions, occurring *in vivo* in the rodent between P0 and P7.

To have a better understanding of thyroid hormone action in the developing brain, the temporal patterns of initiation and cessation of hormone action have to be determined. Most of *in vitro* or *in vivo* experiments explored the effects of hypo- or hyperthyroidism in the cerebellum from P15, or equivalent age in culture. At this age, the characteristic shape of the dendritic arborization is already elaborated, and extrinsic factors such as electrical activity (Schilling et al., 1991) from granular cells, trophic factors (Lindholm et al., 1993; Mount et al., 1995; Hirai and Launey, 2000; Swinny et al., 2004) and TH modulate the growth of the dendritic arborization (Nicholson and Altman, 1972b). Elegantly performed studies have shown a role for TH in the persistence of the EGL and the migration of granular cells into the internal granule layer (Nicholson and Altman, 1972a, b; Rabie and Legrand, 1973), as well as a direct role of TH on PC through TR α 1 receptor activation (Heuer and Mason, 2003).

II. Rôle de ROR α dans la différenciation neuronale :

2. Article III - L'action de la T₃ dans la différenciation précoce des cellules de Purkinje implique ROR α

However, the effects of TH on PC dendritic differentiation during early steps which does not require cell-cell interaction have not been shown.

Our results suggest that T₃ plays a key role in the early differentiation of PCs in organotypic cultures, before the formation of the elaborated dendritic tree.

Cross-talk between ROR α and the TH pathways.

Interestingly, T₃ addition led to an increased expression of ROR α in the Purkinje cells and interneurons. This result is in accordance with previous study which showed a decreased expression of ROR α in the cerebellum of hypothyroid rats (Koibuchi et al., 2001), whereas T₄ replacement led to increased expression (Koibuchi and Chin, 1998).

Our results suggest that ROR α 1 expression is required for the T₃-induced effect on the early dendritic differentiation. TH might therefore act on the early differentiation process through an increased expression of the *Rora* gene. TH binds to the nuclear TH receptor (TR), a ligand-regulated transcription factor, which then binds to a target DNA sequence known as a TH-response element (TRE) within the promoter region of target genes. Interestingly, *in silico* analysis using Transcription Element Search System (TESS) site (<http://www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess/tess>) of the genomic 5' flanking region of the *Rora* gene revealed TR β -response element (in position -665, -1997 and -2760 from the ATG initiator codon of the gene), but further studies are needed to demonstrate that TR β is able to bind the corresponding TRE within the *Rora* promoter region and activate the transcription of the *Rora* gene.

Another level of interaction between ROR α and TR has been demonstrated by Koibuchi and collaborators (Koibuchi et al., 1999) since ROR α 1 increases the TR-induced transactivation on several TREs. This could account for ROR α requirement in the T₃-mediated promoted differentiation observed in this study. TR binds DNA as a monomer, homodimer, or heterodimer (particularly with retinoid X receptors) to TRE, composed of two half-site core motifs (AGGTCA) with specific nucleotide spacing and orientation. ROR α binds as monomer to a consensus motif composed of a 6-bp AT-rich sequence 5' to a half-site core motif, AGGTCA (ROR-response element, RORE), to activate transcription (Giguere et al., 1994). Both TR and ROR α are thus transcription factors that share the common core motif within their response elements. ROR α 1 is able to bind as a monomer to one of two core motifs (AGGTCA) of a TRE preceded by an AT-rich sequence (Giguere et al., 1994;

II. Rôle de ROR α dans la différenciation neuronale :

2. Article III - L'action de la T₃ dans la différenciation précoce des cellules de Purkinje implique ROR α

Koibuchi et al., 1999). This suggests that a subset of natural TREs containing appropriate AT-rich sequences could serve as dual-response elements for TR and ROR α .

Intrinsic effect of ROR α and its potential coordination with TH in the PC dendritic differentiation.

ROR α has been shown to be crucial for the early differentiation progression of PCs, in a cell-autonomous manner (Boukhtouche et al., 2006a). In cerebellar slices, T₃ is likely to act on ROR α expression within PCs. Our results extend previous studies of Mason and Heuer (2003) which have clearly demonstrated that Purkinje cells are a direct target of T₃ action through activation of the TH receptor α 1. This later PC dendritic arborisation elaboration, also promoted by TH, is dependent upon granular cell differentiation and synaptogenesis. Interestingly, ROR α has been shown to control the expression of Shh in PCs, which in turn promotes the proliferation of precursor granular cells in the EGL (Gold et al., 2003). Thus, a coordinate mechanism of ROR α and TH in cerebellar development, in which both T₃ and ROR α act on the PC differentiation directly and indirectly via the promoting effect on granular cell development can be proposed. However, the later and direct effects of T₃ on PC differentiation are unlikely to involve ROR α since we have shown that ROR α does not influence this later step of differentiation (Boukhtouche et al., 2006a).

When homozygous, the murine *staggerer* mutation in the *Rora* gene leads to cerebellar atrophy due to the degeneration of most of the PCs (Sidman et al., 1962; Sotelo and Changeux, 1974; Herrup, 1983; Vogel et al., 2000; Doulazmi et al., 2001). Several histological studies of the *Rora*^{sg/sg} cerebellum show that the remaining PCs are immature and display atrophic dendrites, devoid of spines (Bradley and Berry, 1978; Sotelo and Privat, 1978; Sotelo, 1990). The differentiation abnormalities observed in homozygous *staggerer* mice are similar to those observed in hypothyroid rats, but are aggravated in ROR α -deficient mouse. This implies that ROR α acts on additional processes in the cerebellar development, different from the ones induced by thyroid hormones. This hypothesis is strengthened by the recently demonstrated neuroprotective role of ROR α (Boukhtouche et al., 2006b).

In conclusion, our results suggest that ROR α might play a critical role in the early T₃-induced dendritic differentiation of PC.

II. Rôle de ROR α dans la différenciation neuronale :

2. Article III - L'action de la T₃ dans la différenciation précoce des cellules de Purkinje implique ROR α

References

- Aarskog NK, Vedeler CA (2000) Real-time quantitative polymerase chain reaction. A new method that detects both the peripheral myelin protein 22 duplication in Charcot-Marie-Tooth type 1A disease and the peripheral myelin protein 22 deletion in hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. *Hum Genet* 107:494-498.
- Anderson GW (2001) Thyroid hormones and the brain. *Front Neuroendocrinol* 22:1-17.
- Armengol JA, Sotelo C (1991) Early dendritic development of Purkinje cells in the rat cerebellum. A light and electron microscopic study using axonal tracing in 'in vitro' slices. *Brain Res Dev Brain Res* 64:95-114.
- Becker-Andre M, Andre E, DeLamarter JF (1993) Identification of nuclear receptor mRNAs by RT-PCR amplification of conserved zinc-finger motif sequences. *Biochem Biophys Res Commun* 194:1371-1379.
- Boukhtouche F, Janmaat S, Vodjdani G, Gautheron V, Mallet J, Dusart I, Mariani J (2006) Retinoid-Related Orphan Receptor α Controls the Early Steps of Purkinje Cell Dendritic Differentiation. *J Neurosci* 26:1531-1538.
- Boukhtouche F, Vodjdani G, Jarvis CI, Bakouche J, Staels B, Mallet J, Mariani J, Lemaigre-Dubreuil Y, Brugg B (2006b) HROR α 1 overexpression protects neurons against oxidative stress-induced apoptosis. *J Neurochem in press*.
- Bradley P, Berry M (1978) The Purkinje cell dendritic tree in mutant mouse cerebellum. A quantitative Golgi study of Weaver and Staggerer mice. *Brain Res* 142:135-141.
- Carlberg C, Hooft van Huijsduijnen R, Staple JK, DeLamarter JF, Becker-Andre M (1994) RZR α s, a new family of retinoid-related orphan receptors that function as both monomers and homodimers. *Mol Endocrinol* 8:757-770.
- Crepel F (1974) Excitatory and inhibitory processes acting upon cerebellar Purkinje cells during maturation in the rat; influence of hypothyroidism. *Exp Brain Res* 20:403-420.
- Doulazmi M, Frederic F, Capone F, Becker-Andre M, Delhaye-Bouchaud N, Mariani J (2001) A comparative study of Purkinje cells in two ROR α gene mutant mice: staggerer and ROR α (-/-). *Brain Res Dev Brain Res* 127:165-174.
- Ghoumari AM, Wehrle R, De Zeeuw CI, Sotelo C, Dusart I (2002) Inhibition of protein kinase C prevents Purkinje cell death but does not affect axonal regeneration. *J Neurosci* 22:3531-3542.
- Giguere V, Tini M, Flock G, Ong E, Evans RM, Otulakowski G (1994) Isoform-specific amino-terminal domains dictate DNA-binding properties of ROR α , a novel family of orphan hormone nuclear receptors. *Genes Dev* 8:538-553.
- Gold DA, Baek SH, Schork NJ, Rose DW, Larsen DD, Sachs BD, Rosenfeld MG, Hamilton BA (2003) ROR α Coordinates Reciprocal Signaling in Cerebellar Development through Sonic hedgehog and Calcium-Dependent Pathways. *Neuron* 40:1119-1131.
- Hamilton BA, Frankel WN, Kerrebrock AW, Hawkins TL, FitzHugh W, Kusumi K, Russell LB, Mueller KL, van Berkel V, Birren BW, Kruglyak L, Lander ES (1996) Disruption of the nuclear hormone receptor ROR α in staggerer mice. *Nature* 379:736-739.
- Herrup K (1983) Role of staggerer gene in determining cell number in cerebellar cortex. I. Granule cell death is an indirect consequence of staggerer gene action. *Brain Res* 313:267-274.
- Heuer H, Mason CA (2003) Thyroid hormone induces cerebellar Purkinje cell dendritic development via the thyroid hormone receptor α 1. *J Neurosci* 23:10604-10612.
- Hirai H, Launey T (2000) The regulatory connection between the activity of granule cell NMDA receptors and dendritic differentiation of cerebellar Purkinje cells. *J Neurosci* 20:5217-5224.
- Ino H (2004) Immunohistochemical characterization of the orphan nuclear receptor ROR α in the mouse nervous system. *J Histochem Cytochem* 52:311-323.

II. Rôle de ROR α dans la différenciation neuronale :

2. Article III - L'action de la T₃ dans la différenciation précoce des cellules de Purkinje implique ROR α

- Koibuchi N, Chin WW (1998) ROR alpha gene expression in the perinatal rat cerebellum: ontogeny and thyroid hormone regulation. *Endocrinology* 139:2335-2341.
- Koibuchi N, Yamaoka S, Chin WW (2001) Effect of altered thyroid status on neurotrophin gene expression during postnatal development of the mouse cerebellum. *Thyroid* 11:205-210.
- Koibuchi N, Liu Y, Fukuda H, Takeshita A, Yen PM, Chin WW (1999) ROR alpha augments thyroid hormone receptor-mediated transcriptional activation. *Endocrinology* 140:1356-1364.
- Lindholm D, Castren E, Tsoulfas P, Kolbeck R, Berzaghi Mda P, Leingartner A, Heisenberg CP, Tessarollo L, Parada LF, Thoenen H (1993) Neurotrophin-3 induced by tri-iodothyronine in cerebellar granule cells promotes Purkinje cell differentiation. *J Cell Biol* 122:443-450.
- Messer A (1988) Thyroxine injections do not cause premature induction of thymidine kinase in sg/sg mice. *J Neurochem* 51:888-891.
- Messer A, Hatch K (1984) Persistence of cerebellar thymidine kinase in staggerer and hypothyroid mutants. *J Neurogenet* 1:239-248.
- Mount HT, Dean DO, Alberch J, Dreyfus CF, Black IB (1995) Glial cell line-derived neurotrophic factor promotes the survival and morphologic differentiation of Purkinje cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:9092-9096.
- Nicholson JL, Altman J (1972a) The effects of early hypo- and hyperthyroidism on the development of the rat cerebellar cortex. II. Synaptogenesis in the molecular layer. *Brain Res* 44:25-36.
- Nicholson JL, Altman J (1972b) The effects of early hypo- and hyperthyroidism on the development of rat cerebellar cortex. I. Cell proliferation and differentiation. *Brain Res* 44:13-23.
- Nicholson JL, Altman J (1972c) Synaptogenesis in the rat cerebellum: effects of early hypo- and hyperthyroidism. *Science* 176:530-532.
- Oppenheimer JH, Schwartz HL (1997) Molecular basis of thyroid hormone-dependent brain development. *Endocr Rev* 18:462-475.
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:e45.
- Porterfield SP, Hendrich CE (1993) The role of thyroid hormones in prenatal and neonatal neurological development--current perspectives. *Endocr Rev* 14:94-106.
- Rabie A, Legrand J (1973) Effects of thyroid hormone and undernourishment on the amount of synaptosomal fraction in the cerebellum of the young rat. *Brain Res* 61:267-278.
- Schilling K, Dickinson MH, Connor JA, Morgan JI (1991) Electrical activity in cerebellar cultures determines Purkinje cell dendritic growth patterns. *Neuron* 7:891-902.
- Sidman RL, Lane PV, Dickie MM (1962) staggerer, a new mutation in the mouse affecting the cerebellum. *Science* 136:610-612.
- Sotelo C (1990) Cerebellar synaptogenesis: what we can learn from mutant mice. *J Exp Biol* 153:225-249.
- Sotelo C, Changeux JP (1974) Transsynaptic degeneration 'en cascade' in the cerebellar cortex of staggerer mutant mice. *Brain Res* 67:519-526.
- Sotelo C, Privat A (1978) Synaptic remodeling of the cerebellar circuitry in mutant mice and experimental cerebellar malformations. Study "in vivo" and "in vitro". *Acta Neuropathol (Berl)* 43:19-34.
- Swinny JD, Metzger F, J IJ-P, Goukko NV, Gramsbergen A, van der Want JJ (2004) Corticotropin-releasing factor and urocortin differentially modulate rat Purkinje cell dendritic outgrowth and differentiation in vitro. *Eur J Neurosci* 19:1749-1758.
- Thompson CC, Potter GB (2000) Thyroid hormone action in neural development. *Cereb Cortex* 10:939-945.
- Vincent J, Legrand C, Rabie A, Legrand J (1982) Effects of thyroid hormone on synaptogenesis in the molecular layer of the developing rat cerebellum. *J Physiol (Paris)* 78:729-738.
- Vogel MW, Sinclair M, Qiu D, Fan H (2000) Purkinje cell fate in staggerer mutants: agenesis versus cell death. *J Neurobiol* 42:323-337.

II. Rôle de ROR α dans la différenciation neuronale :

2. Article III - L'action de la T₃ dans la différenciation précoce des cellules de Purkinje implique ROR α

Figure legends

Figure 1: Dose-dependant effect of T₃ on early PC dendritic differentiation.

Organotypic cultures of P0 cerebella kept 7 DIV were treated with 0nM T₃ (A-B), 3nM T₃ (C-D), 30nM T₃ (E-F) or 100nM T₃ (G-H). A, C, E, G : PCs were revealed with CaBP immunolabelling. B, D, F, H : Quantitative distribution of PCs between stages I to IV. Fusiform PCs with a bipolar shape are defined as stage I (white arrow), PCs with regressive atrophic dendrites all around the soma are defined as stage II (white arrowhead), PC with one or more perisomatic protrusions are defined as stage III (empty arrow) and PCs with identified dendritic tree are classified in stage IV (empty arrowhead). Scale bar corresponds to 20 μ m.

Figure 2: T₃-induced increased level of ROR α protein in both PC and interneurons.

P0 cerebellar slices kept 7DIV were treated with 0 or 30nM T₃. A: Immunoblot analysis of ROR α in extracts of untreated or T₃-treated cerebellar slices. B: Organotypic cultures after 7 DIV with no T₃ treatment. ROR α -expressing cells are identified by ROR α immunolabelling in green, and PCs were revealed by CaBP immunolabelling in red. Note that all ROR α -expressing cells are PCs in the merged image. C: Organotypic cultures after 7 DIV with 30nM T₃ treatment. ROR α -expressing cells are identified by ROR α immunolabelling in green, and both PCs (empty arrow) and interneurons (white arrow) were revealed by parvalbumin immunolabelling in red. Note that both PCs and interneurons were found to express ROR α , and appear as red cells with yellow nuclear labelling in merged image. D: Fluorescence density of ROR α immunolabelling was measured within each PC nucleus with MetaMorph software. Average values from multiple cells +/- SEM are shown.

Figure 3: mRNA levels of *Rora1* and *Rora4* in T₃-treated organotypic cultures.

P0 organotypic cultures were cultured without T₃ (white bars) or T₃ 30nM (black bars) Levels of mRNA were determined by real time RT-PCR and standardized to *18s rRNA* after 0h, 6h, 24h or 7 days of T₃ treatment. The data presented are shown as the mRNA fold

II. Rôle de ROR α dans la différenciation neuronale :

2. Article III - L'action de la T₃ dans la différenciation précoce des cellules de Purkinje implique ROR α

change from the level in untreated slices at the initial time of culture (0h), obtained from three independent cerebellar slices extracts ($n = 1$).

Figure 4: T₃ treatment failed to induce differentiation in early ROR α -deficient *staggerer* PCs in organotypic cultures.

PCs in organotypic cultures from wild-type (A-C) or ROR α -deficient *Rora*^{sg/sg} (B-D) P0 mice revealed by CaBP immunolabelling after 7 DIV without T₃ (A, B) or with 30nM T₃. PCs from wild-type responded to T₃ treatment: with 0nM T₃, PCs were mostly in stage II (white arrow in A) whereas they were in stages II (empty arrow in C) and III (empty arrowhead in C) under 30nM T₃ treatment. *Rorasg/sg* PCs were unresponsive to T₃ treatment since they remain in stage I (white arrowhead) without (B) or with 30nM T₃ treatment (D). Scale bar represents 20 μ m.

II. Rôle de ROR α dans la différenciation neuronale :
 2. Article III - L'action de la T₃ dans la différenciation précoce des cellules de Purkinje implique ROR α

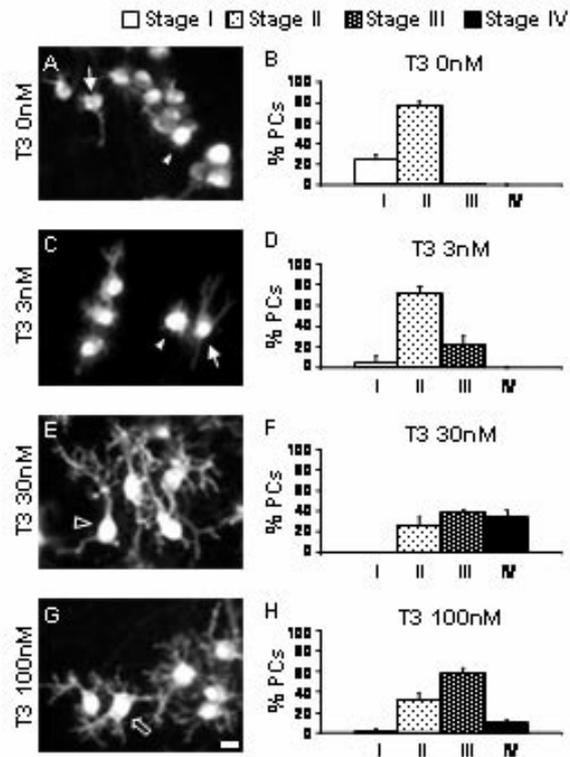


Figure 1

II. Rôle de ROR α dans la différenciation neuronale :
 2. Article III - L'action de la T₃ dans la différenciation précoce des cellules de Purkinje implique ROR α

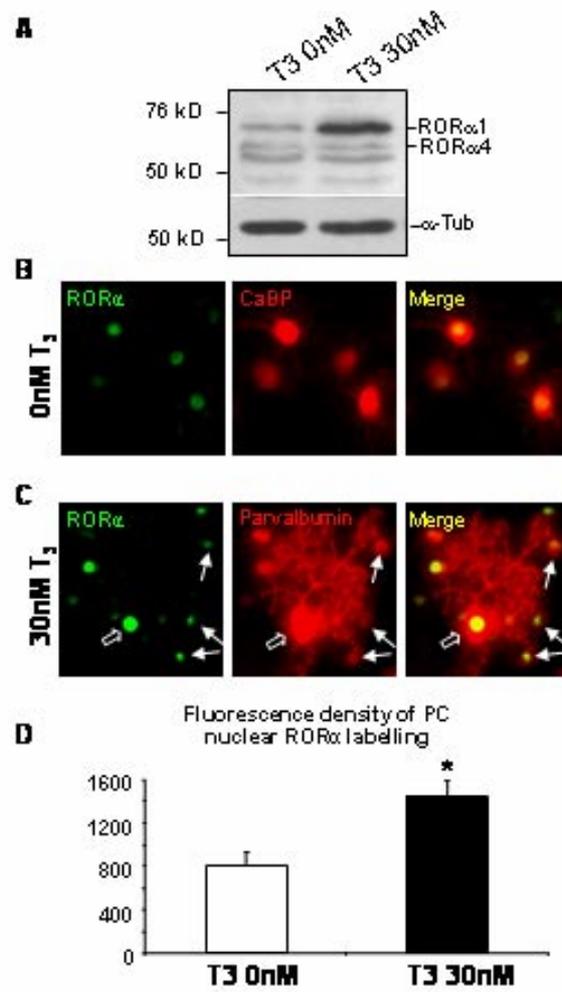


Figure 2

II. Rôle de ROR α dans la différenciation neuronale :
 2. Article III - L'action de la T₃ dans la différenciation précoce des cellules de Purkinje implique ROR α

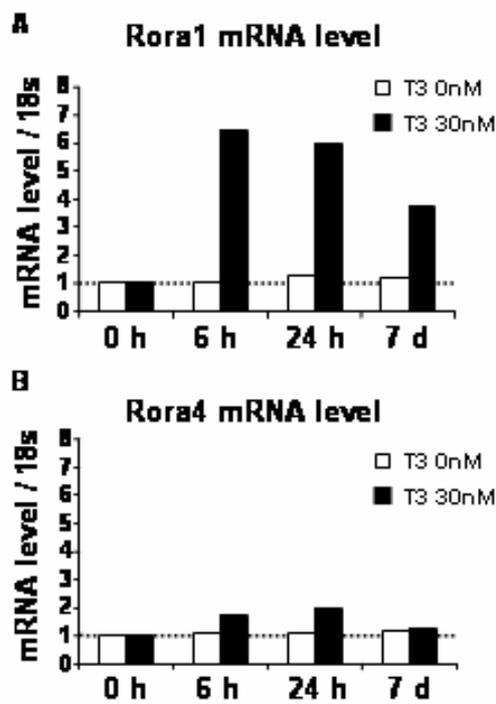


Figure 3

II. Rôle de ROR α dans la différenciation neuronale :
 2. Article III - L'action de la T₃ dans la différenciation précoce des cellules de Purkinje implique ROR α

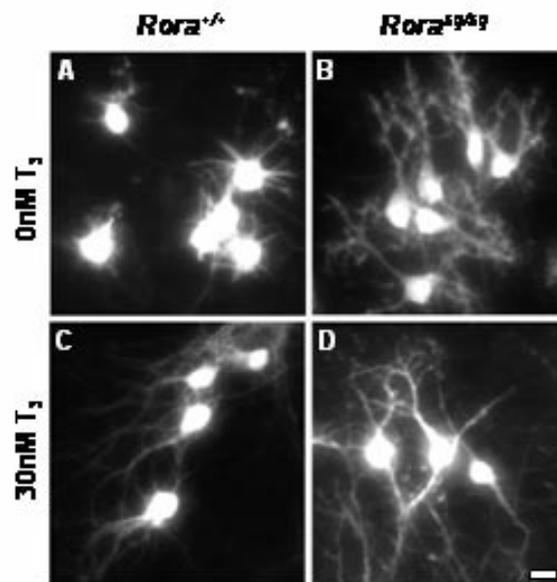


Figure 4

DISCUSSION

Dans ce travail de thèse, je me suis intéressée au rôle de ROR α dans la survie et la différenciation neuronale. Le phénotype cérébelleux du mutant *staggerer* (mutant "perte de fonction" de ROR α) était bien connu; en s'appuyant sur ces données, le but de mon travail a été de déterminer la (les) fonction(s) cellulaire(s) de ROR α afin de mieux comprendre son rôle dans le développement du cervelet.

Bien que le ligand physiologique de ROR α ait été identifié, ROR α reste un récepteur nucléaire dont la manipulation est rendue difficile par l'absence d'effecteur pharmacologique capable de moduler son activité transcriptionnelle. En effet, son ligand est très vraisemblablement le cholestérol ou le sulfate de cholestérol (Kallen *et al.*, 2002; Bitsch *et al.*, 2003), une molécule abondante dans les cellules et indispensable à diverses fonctions cellulaires. Ainsi, moduler l'activité de ROR α en modifiant les concentrations cellulaires de cholestérol entraîne des dysfonctionnements cellulaires importants, indépendants de ROR α : on peut citer en exemple l'influence du taux de cholestérol sur la fluidité membranaire. Afin de moduler l'activité de ROR α , nous avons choisi de moduler son expression. Il a été montré que ROR α est actif de façon constitutive, tout du moins actif sans apport de ligand exogène (Atkins *et al.*, 1999), ceci étant très probablement lié au fait que les cellules contiennent suffisamment de cholestérol pour permettre l'activité de ROR α .

Afin de mieux comprendre les fonctions de ROR α dans le développement du cervelet, nous nous sommes demandé si la surexpression de ROR α pouvait jouer un rôle dans la différenciation et la survie de neurones en culture dans 2 modèles: cultures primaires de neurones corticaux et cultures organotypiques de cervelet. Nous avons en outre analysé en culture la différenciation de cellules de Purkinje dépourvues de ROR α puisque, de façon très inattendue, les cellules de Purkinje issues de cervelets de souris *Rora*^{sg/sg} survivent très bien en culture.

Notre étude nous a permis de mettre en évidence que ROR α peut exercer un rôle neuroprotecteur en diminuant le stress oxydatif dans les neurones via des protéines anti-oxydantes telles que la Glutathion peroxydase 1 (Gpx1) et la Peroxiredoxine 6 (Prx6).

Nous avons aussi mis en évidence le rôle crucial de ROR α dans la différenciation précoce des cellules de Purkinje, et montré que ROR α est un acteur moléculaire déterminant dans l'action de l'hormone thyroïdienne T₃ dans cette phase précoce de différenciation dendritique.

Je discuterai les résultats obtenus ainsi que les hypothèses quant au mode d'action de ROR α pendant le développement et le vieillissement du cervelet.

I. ACTION DE ROR α DANS LA SURVIE NEURONALE

I.1. ROR α protège les neurones corticaux en culture en régulant le stress oxydatif.

Le stress oxydatif, lié à une forte production de radicaux libres, induit une toxicité cellulaire qui peut mener à la mort cellulaire. Cette toxicité est liée à une forte concentration en ions hydroxyles, responsables d'une attaque radicalaire des composés cellulaires et de la dégradation de nombreuses molécules organiques, en particulier de la cassure des double-brins d'ADN et de la désorganisation des lipides, qui a des conséquences graves sur l'intégrité des membranes. Il est à noter que la production de radicaux libres n'est pas forcément toxique; en effet, elle est très souvent impliquée dans la transduction du signal, puisque de nombreuses protéines voient leur fonction modulée en fonction de leur état redox: on peut citer en exemple l'oxydation des ponts disulfures intra- ou inter-protéiques. La production de radicaux libres devient toxique lorsque les mécanismes de détoxification sont insuffisants, comme c'est le cas lors d'un stress trop important lié par exemple à un agent oxydant pro-apoptotique. Cette insuffisance des mécanismes de détoxification est mise en cause dans les processus de sénescence cellulaire, ce qui conduit à suggérer que les radicaux libres jouent un rôle prépondérant dans le vieillissement. Le stress oxydatif semble être un élément causal dans l'induction de la mort par nombre d'agents pro-apoptotiques. De plus, lors de la mort cellulaire, qu'elle soit ou non de nature apoptotique, le dysfonctionnement mitochondrial conduit à un stress oxydatif, qui favorise la mort cellulaire.

Les neurones sont des cellules particulièrement sensibles au stress oxydatif. Nous avons montré que ROR α est capable de protéger partiellement des neurones corticaux en culture primaire contre l'apoptose induite par différents inducteurs: le peptide A β (25-35), le c₂-céramide ou encore le peroxyde d'hydrogène H₂O₂ (Article I). Ces molécules induisent l'apoptose en induisant un stress oxydatif: en effet, l'ajout concomitant d'anti-oxydants permet de bloquer l'apoptose induite par ces agents. Nous avons ainsi analysé la production de radicaux libres dans les neurones et avons observé une diminution significative dans les neurones qui surexpriment ROR α . Nous avons par la suite montré que la protection est en

partie liée à une augmentation de l'expression de protéines anti-oxydantes Gpx1 et Prx6. La surexpression de ROR α permet donc une meilleure protection contre un stress oxydant. ROR α contrôle-t-il transcriptionnellement l'expression de ces enzymes anti-oxydants? La question reste posée. On peut émettre l'hypothèse que ROR α active la transcription de ces gènes. Une recherche *in silico* a mis en évidence un RORE (élément de réponse à ROR α) potentiel dans le promoteur du gène codant pour Prx6. Bien que ces enzymes soient en partie responsables de la neuroprotection conférée par ROR α , le niveau de surexpression est relativement peu important (d'un facteur 2,5 et 2,7 pour Gpx1 et Prx6 respectivement), et on ne peut exclure l'hypothèse que ROR α ne contrôle pas directement l'expression de ces gènes, suggérant que cette surexpression n'est pas la conséquence d'une activation transcriptionnelle par ROR α sur leur promoteur. Dans les neurones corticaux surexprimant ROR α , nous avons analysé l'expression d'autres protéines impliquées dans la dégradation des radicaux libres et avons observé une augmentation significative de l'expression de la peroxyredoxine 4 (Prx4; un enzyme de la famille de Prx6) et de la thioredoxine 2 (un co-facteur des peroxyredoxines). De façon intéressante, l'expression du gène codant Prx4 est diminuée dans le cervelet des souris *staggerer* comparé aux sauvages à l'âge embryonnaire E17 (Gold *et al.*, 2003). Ceci suggère que ROR α entraîne une augmentation de l'expression de ces enzymes *in vivo* chez la souris. Par ailleurs, le gène codant pour l'homologue de Prx6 chez la drosophile est surexprimé en réponse à une augmentation de l'expression de DHR3 (White *et al.*, 1999), l'homologue de ROR α chez la drosophile: ce mécanisme anti-oxydant est donc déjà présent chez la drosophile. L'augmentation de l'expression de plusieurs gènes ayant la même fonction n'exclut pas que l'effet de ROR α sur l'expression de ces gènes soit indirect, et qu'il mette en jeu une réponse adaptée suite à un stress cellulaire important.

Il serait intéressant de savoir si ROR α exerce ce rôle anti-oxydant dans d'autres tissus de l'organisme. En effet, qu'il soit direct ou indirect, l'effet anti-oxydant de ROR α pourrait participer à la protection observée contre les processus liés à l'âge, tels que l'inflammation chronique, l'ostéoporose et l'athérosclérose. La physiopathologie de ces maladies implique un stress oxydatif important, contre lequel ROR α pourrait agir, et ainsi diminuer la progression de ces pathologies.

I.2. Rôle neuroprotecteur de ROR α dans les cellules de Purkinje en culture organotypique

Dans un modèle de culture qui pourrait reproduire ou se rapprocher de l'apoptose développementale intervenant *in vivo*, nous avons également mis en évidence un effet neuroprotecteur de ROR α . Lors de la mise en culture des tranches de cervelet de souris ou de rat, un grand nombre de cellules de Purkinje meurt dans les premiers temps de la culture, comme c'est le cas pour bon nombre de cultures primaires qui font intervenir une dissection des tissus. Cependant, dans les cultures organotypiques de cervelet, l'importance de cette mort dépend de l'âge auquel la culture est réalisée. Alors qu'une mort cellulaire intervient pour une mise en culture jusqu'à P0 et après P7, la mort est massive pour des tranches de cervelet mises en culture entre P1 et P5, avec un pic pour les cultures réalisées à P3 (Dusart *et al.*, 1997; Ghomari *et al.*, 2000). Ces résultats ont suggéré que la mort de ces cellules, ou plutôt leur mauvaise survie en culture, est le reflet d'une mort physiologique qui interviendrait *in vivo* à cette période. Dans ce modèle de culture, nous avons montré que ROR α permet une meilleure survie des cellules de Purkinje à tous les âges testés, à savoir dans des cultures observées après 7 jours *in vitro* à partir de cervelets prélevés à E17, P0, P3 et P5. Cependant, la surexpression de ROR α ne permet pas de limiter la mort des cellules de Purkinje liée à l'âge de la mise en culture. En effet, on observe, dans les tranches infectées par le Lenti-hROR α 1, que la survie diminue entre E17 et P5, même si elle est toujours meilleure que dans les cultures contrôles.

ROR α est donc capable de protéger les cellules de Purkinje, mais permet une bien meilleure survie dans les tranches réalisées à E17 et P0, comparé à celles réalisées à P3 et P5. Ceci peut être relié à une certaine latence de l'expression du transgène hROR α 1 par le vecteur lentiviral. Nous avons observé que la mort des cellules de Purkinje dans les tranches touche une sous-population en particulier (cette observation sera discutée dans le §III), et la mort massive des cellules de Purkinje intervient dans les premières 24 heures pour les tranches réalisées à P3 et P5, alors qu'elle intervient après plusieurs jours dans les tranches réalisées à E17 et P0. Ainsi, les cellules de Purkinje infectées par le vecteur Lenti-hROR α 1 pourraient mourir avant que le transgène n'ait eu le temps de s'exprimer, ce qui *de facto* supprime toute neuroprotection éventuelle. On peut cependant proposer une autre hypothèse pour expliquer ces différences d'efficacité de protection en fonction de l'âge: l'activité de ROR α elle-même

pourrait dépendre de l'âge du cervelet, ou plus précisément du stade de différenciation des cellules de Purkinje.

I.3. Hypothèses sur l'influence de ROR α sur la survie des neurones au cours du développement et du vieillissement.

ROR α est indispensable à la survie des cellules de Purkinje pendant le développement du cervelet *in vivo*, et est également impliqué dans la survie des cellules de Purkinje pendant le vieillissement. Ce rôle est cohérent avec nos résultats concernant le rôle neuroprotecteur de ROR α .

En effet, il est établi que les neurones subissent une mort développementale, et leur survie semble dépendre, au moins dans certains cas, de leur capacité à accéder à une quantité suffisante de facteurs trophiques (Hamburger et Levi-Montalcini, 1949). Il a été montré dans des modèles cellulaires qu'une carence en facteurs trophiques entraîne une production accrue de radicaux libres responsable de l'induction de la mort (Satoh *et al.*, 1996). On peut émettre l'hypothèse qu'en diminuant le stress oxydatif dans les neurones, ROR α limite leur mort *in vivo* au cours du développement, pendant une période pendant laquelle ils sont en compétition pour accéder à une quantité suffisante de facteurs trophiques. Chez le mutant homozygote *staggerer*, la diminution de ce potentiel anti-oxydant pourrait être critique pour la survie des cellules de Purkinje lors de l'apoptose développementale. Cette hypothèse est renforcée par la coïncidence de la période supposée d'apoptose développementale des cellules de Purkinje (située dans une fenêtre allant de P1 à P7; Zanjani *et al.*, 1996; Dusart *et al.*, 1997; Ghomari *et al.*, 2000; Kitao *et al.*, 2004; Marin-Teva *et al.*, 2004) et la période supposée de mort des cellules de Purkinje chez le mutant *Rora*^{sg/sg} est située *in vivo* entre P0 et P5 (Vogel *et al.*, 2000).

Le stress oxydatif semble jouer également un rôle crucial dans la mort cellulaire liée au vieillissement. En effet, une plus grande vulnérabilité face au stress oxydatif - ou une diminution du potentiel de défense - liée au vieillissement semble intervenir dans la mort cellulaire (pour revue, voir Higami et Shimokawa, 2000; Joseph *et al.*, 2000; Sohal *et al.*, 2002). Bien que suffisante pour permettre la survie des cellules de Purkinje au cours du développement, une demi-dose de protéines ROR α chez les mutants hétérozygotes ne permet pas la survie optimale des cellules de Purkinje au cours du vieillissement. On peut donc

supposer que l'effet anti-oxydant de ROR α protège également les cellules de Purkinje au cours du vieillissement.

Par ailleurs, l'atrophie du bulbe olfactif décrite chez les mutants *Rora*^{sg/sg} (Monnier *et al.*, 1999) suggère que ROR α joue un rôle dans la survie des neurones de cette structure pendant le développement. Ainsi, la perte de l'expression de protéines ROR α fonctionnelles entraîne des anomalies de survie neuronale au cours du développement dans le cervelet et dans le bulbe olfactif. Cependant, et étonnamment, bien que ROR α soit fortement exprimé dans d'autres régions du cerveau telles que le cortex cérébral (couche IV), le thalamus et le noyau suprachiasmatique, aucune anomalie de survie de ces neurones n'a été décrite à ce jour. Ces données suggèrent que ROR α n'exerce pas la même fonction de survie dans tous les tissus, ou que la perte de la fonction de ROR α est compensée dans ces autres structures.

Dans l'hypothèse d'une compensation de la fonction de ROR α dans les structures qui ne dégénèrent pas chez le mutant *staggerer*, ROR β est un candidat intéressant. ROR β est un récepteur nucléaire de la famille des RORs, codé par le gène *Rorb* (voir Introduction §1.2). Le phénotype de la souris invalidée pour le gène *Rorb* suggère que ce récepteur nucléaire exerce un rôle dans la survie cellulaire de certaines structures, en particulier de la rétine. ROR β est fortement exprimé dans le cerveau, en particulier dans les neurones de la couche IV du cortex, dans le thalamus, le noyau suprachiasmatique de l'hypothalamus, la glande pinéale (ou épiphyse) et la rétine (Becker-Andre *et al.*, 1994; Schaeren-Wiemers *et al.*, 1997). Si l'on compare ce patron d'expression avec celui de ROR α (Matsui *et al.*, 1995; Sashihara *et al.*, 1996; Steinmayr *et al.*, 1998), on peut observer que l'expression coïncide pour toutes ces structures, excepté pour le cervelet et le bulbe olfactif, structures dans lesquelles ROR α est exprimé, mais pas ROR β . Chez le mutant *staggerer*, ce sont en particulier ces deux structures qui dégénèrent: on peut donc émettre l'hypothèse que l'absence de ROR α est compensée par l'expression de ROR β qui permet alors une survie neuronale, excepté dans le cervelet et le bulbe olfactif. ROR α et ROR β sont deux récepteurs nucléaires qui présentent de fortes homologues de séquence - 91% pour le domaine de fixation à l'ADN - et sont capables de se fixer sur le même élément de réponse (RORE). Ceci suggère que ROR β pourrait réguler l'expression de gènes identifiés comme étant des cibles de ROR α , en particulier en absence de ROR α .

On peut proposer d'autres mécanismes de compensation ou de régulation différentielle de l'activité de ROR α dans les différentes structures du cerveau qui expriment ROR α mais qui ne dégèrent pas chez le mutant *staggerer*. Rev-Erb α , un autre récepteur nucléaire orphelin qui interagit négativement avec ROR α à différents niveaux (voir Introduction, § I.3.5, I.4 et I.5), est fortement exprimé dans les cellules de Purkinje et dans les cellules granulaires du bulbe olfactif (Chomez *et al.*, 2000), cellules qui dégèrent chez le mutant *staggerer*. La souris déficiente pour Rev-Erb α présente des anomalies de développement du cervelet (Chomez *et al.*, 2000). ROR α et Rev-Erb α entrent en compétition dans la régulation de l'expression de nombreux gènes: ROR α a un effet activateur alors que Rev-Erb α a au contraire un effet répresseur sur la transcription de ses gènes cibles. L'absence de ROR α dans des cellules qui expriment fortement le récepteur antagoniste Rev-Erb α pourrait donc être critique pour la survie des neurones.

II. ACTION DE ROR α DANS LA DIFFERENCIATION NEURONALE

Bien que le phénotype cérébelleux le plus apparent chez les souris homozygotes *staggerer* soit la mort massive des cellules de Purkinje accompagnée de l'absence des grains, les anomalies de différenciation des cellules de Purkinje sont très importantes. En effet, les cellules de Purkinje survivantes dans le cervelet adulte des mutants présente des caractéristiques embryonnaires: elles continuent d'exprimer des protéines qui sont normalement exprimées seulement au stade embryonnaire (Hatten et Messer, 1978; Trenkner, 1979; Edelman et Chuong, 1982) et leur multi-innervation par les fibres grimpanes persiste anormalement (Crepel *et al.*, 1980; Mariani et Changeux, 1980). Par ailleurs, l'arborisation dendritique est rudimentaire (Bradley et Berry, 1978; Sotelo, 1978, 1990).

Comme la plupart des neurones dans le système nerveux central, les cellules de Purkinje ont une morphologie bipolaire pendant leur migration. Lors de leur différenciation, un processus de régression des prolongements neuritiques se produit dans ces cellules, avant qu'elles ne développent leur arbre dendritique terminal. La différenciation tardive des cellules de Purkinje (qui concerne l'expansion de l'arbre dendritique) dépend - entre autres - d'interactions cellulaires (en particulier avec les grains, voir Introduction §II.4.3 et §II.5); au contraire, l'étape de régression semble indépendante de ces interactions (Baptista *et al.*, 1994).

L'hormone thyroïdienne est un facteur crucial dans le contrôle de la différenciation des neurones, et en particulier des cellules de Purkinje du cervelet (voir Introduction §II.5.4; Nicholson et Altman, 1972a, b; Lauder, 1978; Vincent *et al.*, 1982). Son rôle est relativement bien documenté dans les phases tardives de la différenciation de l'arbre dendritique, celles qui mènent à la formation de l'arborisation complexe caractéristique des cellules de Purkinje. Bien qu'il ait été montré que les hormones thyroïdiennes jouent un rôle important dès la naissance, leur rôle dans les étapes précoces de différenciation dendritique est mal connu à ce jour.

II.1. Rôle de ROR α dans la différenciation des cellules de Purkinje

Nous avons montré que ROR α est crucial pour l'étape de régression des neurites des cellules de Purkinje au stade bipolaire embryonnaire (stade I). Alors que l'absence de ROR α chez les mutants homozygotes *staggerer* entraîne en culture organotypique un arrêt de la différenciation des cellules de Purkinje à ce stade (les cellules de Purkinje ne parviennent pas à entamer la régression des neurites), la surexpression de ROR α accélère l'étape de régression. Cette étape est totalement dépendante de l'expression de protéines ROR α fonctionnelles puisque l'expression de ROR α par transduction lentivirale dans des cultures issues de cervelet *staggerer* permet de restaurer la progression normale de la différenciation. Cet effet est vraisemblablement intrinsèque puisque la surexpression de ROR α dans une cellule de Purkinje n'a pas d'effet sur la différenciation dendritique des cellules de Purkinje voisines. Ces observations, en accord avec quelques études antérieures, suggèrent que l'étape de différenciation dendritique précoce met en jeu des mécanismes intrinsèques, et ne nécessite pas de facteurs extrinsèques tels que les interactions cellulaires (Sotelo, 1978; Baptista *et al.*, 1994).

La surexpression de ROR α dans les cellules de Purkinje au stade bipolaire (stade I) entraîne donc l'accélération de la différenciation jusqu'au stade IV. Cependant, de façon inattendue, la surexpression de hROR α 1 n'a eu aucun effet sur la croissance des dendrites de cellules de Purkinje à P7, à un stade où elles ont déjà élaboré des protrusions dendritiques et mis en place un arbre dendritique (stades III et IV), suggérant que ROR α n'intervient pas dans la croissance dendritique tardive. L'effet de ROR α , crucial dans les cellules de Purkinje avant que l'arbre dendritique n'ait été élaboré, ne semble plus essentiel pour la croissance des dendrites dans des cellules de Purkinje en stade IV. La surexpression de ROR α à un stade

précoce permet certes l'accélération des phases tardives, mais seulement si la surexpression a eu lieu dans des cellules de Purkinje qui n'ont pas encore élaboré d'arbre dendritique. Quant au rôle de ROR α dans les étapes intermédiaires, à savoir la transition stade II - stade III, il a été difficile de le tester. Pour répondre à cette question, nous avons testé l'effet de la surexpression de hROR α 1 dans des cellules de Purkinje mises en culture à P3 ou P5, lorsqu'elles sont *in vivo* dans un stade "cellule étoilée" pour la plupart d'entre elles (stade II). Nous avons observé que les cellules de Purkinje en stade II ne survivent pas en culture (cette observation sera discutée dans le §III.). Nous avons néanmoins tenté de surexprimer ROR α dans des cellules de Purkinje qui auraient atteint le stade II dans des cultures réalisées à P0, après 7 jours en culture. Malheureusement, la transduction à l'aide du lentivirus s'est révélée très peu efficace dans des tranches après 7 jours en culture, ce qui ne nous a pas permis de réaliser d'étude quantitative. Nous n'avons donc pu répondre à cette question.

ROR α est exprimé dans le cervelet et en particulier dans les cellules de Purkinje dès E14 et jusqu'à l'âge adulte. ROR α est particulièrement nécessaire à la différenciation précoce de ces cellules, mais ne semble plus l'être dans les étapes plus tardives bien qu'il soit encore exprimé. Ces résultats soulèvent le problème du contrôle de l'activité de ROR α (voir Introduction §I.3.4.). Les récepteurs nucléaires sont des facteurs de transcription dont l'activité est classiquement régulée par la fixation de leur ligand. Dans le cas particulier de ROR α , le ligand est le cholestérol, une molécule abondante dans les cellules au niveau des membranes, mais dont la concentration et sa régulation dans le cytoplasme et dans le noyau ne sont, à notre connaissance, pas décrits dans la littérature. Le cholestérol est-il capable *in vivo* de modifier l'activité de ROR α ? la question reste posée aujourd'hui. Par ailleurs, ROR α semble être actif de façon constitutive, sans apport de ligand exogène dans le milieu (Atkins *et al.*, 1999). Il serait intéressant de déterminer *in vivo* les mécanismes de contrôle de l'activité de ROR α . Dans le cervelet en développement, on peut toutefois supposer un rôle critique de Rev-Erb α dont l'expression débute à P7 dans le cervelet (Chomez *et al.*, 2000), et dont les interactions avec ROR α sont multiples (voir Introduction §I.3.5, I.4 et I.5).

II.2. Rôle des hormones thyroïdiennes dans la différenciation précoce des cellules de Purkinje

Les hormones thyroïdiennes jouent un rôle crucial dans le développement post-natal du cerveau (Oppenheimer et Schwartz, 1997; Anderson, 2001). En effet, une hypothyroïdie congénitale entraîne chez l'homme le syndrome connu sous le terme "crétinisme", lié en partie aux anomalies développementales du cerveau. Le cervelet est également très atteint. Chez le rat, une carence en hormones thyroïdiennes dans la période périnatale entraîne des anomalies de différenciation des cellules de Purkinje, et de migration des cellules granulaires post-mitotiques (Altman, 1972a, b). Les effets des hormones thyroïdiennes ont été longtemps supposés médiés par les grains. Cependant, des études récentes montrent que l'hormone thyroïdienne T_3 peut agir directement sur les cellules de Purkinje via le récepteur $TR\alpha 1$ (Heuer et Mason, 2003).

II.2.1. Effet de l'hormone T_3 sur la différenciation des cellules de Purkinje en culture organotypique

Alors que les effets des hormones thyroïdiennes sont connus dans les étapes de différenciation dendritique tardive, nous montrons que la T_3 est capable d'induire l'accélération de la différenciation dendritique dans les étapes précoces. En effet, l'ajout de 30 nM de T_3 dans le milieu défini de cultures organotypiques entraîne l'accélération de la différenciation dans des cultures réalisées à P0, lorsque les cellules de Purkinje sont donc dans le stade I de différenciation au moment de la mise en culture. La T_3 entraîne également cet effet dans des cultures réalisées à E17, lorsque les cellules de Purkinje sont dans un stade de différenciation encore plus précoce. Cette accélération de la différenciation s'accompagne d'une augmentation de l'expression de $ROR\alpha$ au niveau ARNm et protéique. Nous avons vu précédemment que $ROR\alpha$ était impliqué de façon cruciale dans les étapes précoces de différenciation dendritique. Ce résultat suggère donc que $ROR\alpha$ contribue à la différenciation induite par l'hormone thyroïdienne dans cette étape. Cette hypothèse est renforcée par le fait que l'hormone thyroïdienne n'exerce aucun effet sur la différenciation des cellules de Purkinje des homozygotes *staggerer* qui restent bloquées dans le stade précédent la régression des neurites. Il semble donc que, pour exercer son rôle dans la différenciation précoce, la voie induite par l'hormone T_3 requiert l'expression de protéines $ROR\alpha$ fonctionnelles.

II.2.2. Lien entre les voies de l'hormone thyroïdienne et ROR α

Chez les mutants *staggerer*, en dépit d'un niveau normal d'hormones thyroïdiennes dans le sérum (Messer et Hatch, 1984) et d'une expression normale des récepteurs aux hormones thyroïdiennes (Hamilton *et al.*, 1996), l'activité de la thymidine kinase n'est pas régulée chez les mutants *staggerer* en condition d'hyperthyroïdie, contrairement aux souris sauvages chez lesquelles on peut observer une augmentation de l'activité de cet enzyme dans ces conditions (Messer, 1988). Ceci suggère, en accord avec nos résultats dans la différenciation des cellules de Purkinje en culture organotypique, que l'action des hormones thyroïdiennes nécessite l'expression de ROR α pour être effective. Cependant, ces études n'ont pas permis de distinguer si ROR α est un facteur qui agit en synergie avec les récepteurs des hormones thyroïdiennes (TRs), ou si ROR α est un gène cible d'un TR activé par les hormones thyroïdiennes.

Les TRs se fixent sur leur élément de réponse (TRE) dans le promoteur de leurs gènes cibles et active leur expression en présence de l'hormone (alors qu'ils la répriment en son absence). Les TRs existent sous deux formes, α ou β , et sont capables de se fixer en monomère, homodimère ou hétérodimère (le plus souvent avec RXR) sur le TRE, qui est composé de deux demi-sites AGGTCA en position directe et séparés d'un nombre variable de nucléotides (voir Introduction, figure 8). L'élément de réponse de ROR α (RORE) quant à lui est composé d'un site AGGTCA précédé d'une séquence de 6 paires de bases riche en A/T. On peut supposer que ROR α et TR peuvent réguler l'expression de même gènes dans le cas où ils comportent en amont des deux demi-sites AGGTCA, la séquence riche en A/T nécessaire à la fixation de ROR α , comme tel est le cas pour le gène *γ F-crystalline* (Tini *et al.*, 1994; Tini *et al.*, 1995). En effet, dans le cas où les deux motifs AGGTCA sont précédés d'une séquence riche en A/T, ROR α est capable d'augmenter l'effet transactivateur de TR, probablement en se fixant sur le premier motif AGGTCA précédé d'une séquence riche en A/T alors que TR α 1 se fixe en monomère sur le deuxième motif AGGTCA (Koibuchi *et al.*, 1999). De plus, certains gènes ont dans leur promoteur à la fois un TRE et un RORE, tel que le gène *Pcp-2* (Zou *et al.*, 1994; Matsui, 1997), suggérant une possible action synergique de ROR α et de TR activé par la TH sur la régulation de ces gènes cibles. Ces données suggèrent que ROR α peut interagir dans la voie médiée par l'hormone thyroïdienne en interagissant directement avec le TR sur le

promoteur de gènes cibles dans les cellules de Purkinje, puisque ces deux récepteurs y sont exprimés.

Certaines études suggèrent également un contrôle de l'expression de *Rora* par la voie médiée par l'hormone thyroïdienne. En effet, l'expression de *Rora* est diminuée dans le cervelet des rats hypothyroïdiens alors qu'un traitement par l'hormone thyroïdienne T_4 permet de rétablir l'expression normale de *Rora* (Koibuchi et Chin, 1998; Koibuchi *et al.*, 2001). Cependant cette observation ne démontre pas un effet direct car on ne peut exclure une diminution de l'expression de $ROR\alpha$ dans des cellules de Purkinje dont la différenciation est anormale en condition d'hypothyroïdie. Notre étude réalisée dans les cultures organotypiques de cervelet à P0 montre elle aussi une augmentation des ARNm du gène *Rora1* en réponse à un traitement par l'hormone T_3 , suggérant une augmentation de l'expression du gène. Notre étude ne permet pas de déterminer si *Rora* est un gène cible d'un TR, bien qu'une analyse *in silico* du promoteur du gène *Rora* ait révélé la présence de TRE putatifs. Des études supplémentaires sont nécessaires pour déterminer si $TR\alpha$ ou $TR\beta$ est capable de se fixer sur ces séquences et de réguler l'expression de *Rora*.

II.2.3. Le rôle de $ROR\alpha$ dans la différenciation est-il restreint aux cellules de Purkinje de souris?

$ROR\alpha$ intervient de façon cruciale dans la différenciation précoce des cellules de Purkinje, en partie dans les premières étapes qui concernent la régression des neurites dans les cellules de Purkinje de morphologie bipolaire, réminiscente de leur phase de migration.

$ROR\alpha$ est un récepteur nucléaire exprimé dans de nombreux types neuronaux dans le système nerveux central. Nous avons montré (voir article I) que $ROR\alpha$ était exprimé dès E14 dans les neurones corticaux, mais il est également exprimé dans les neurones de nombreuses structures du cerveau (Matsui *et al.*, 1995; Sashihara *et al.*, 1996; Steinmayr *et al.*, 1998; Ino, 2004). Il serait donc intéressant de savoir si $ROR\alpha$ exerce également un rôle dans la différenciation d'autres neurones. Dans des expériences très préliminaires, nous avons testé si $ROR\alpha$ pouvait exercer un rôle dans la différenciation de neurones corticaux en culture primaire. Ainsi, dans le modèle de culture décrit dans l'article I, nous avons surexprimé h $ROR\alpha1$ par transfection dans les neurones le jour de la mise en culture, à E14. A cet âge, les neurones sont post-mitotiques et sont très peu différenciés, dépourvus d'arborisation dendritique. Dans ce modèle, les neurones contrôles se différencient de façon autonome. Nous

avons pu observé dans ces expériences que la surexpression de hROR α 1 entraînait une accélération de la différenciation: la longueur des neurites ainsi que le nombre de branchements neuritiques était significativement plus élevés après 2 et 3 jours en culture. La différence n'est cependant plus significative les jours suivants. Ces résultats suggèrent que l'effet de ROR α dans la différenciation précoce des neurones n'est pas restreint aux cellules de Purkinje du cervelet.

Les mécanismes génétiques contrôlant la régression dendritique et plus largement le remodelage des neurites au cours du développement sont assez peu connus chez les mammifères. En effet, ROR α est le premier facteur impliqué dans cette étape cruciale de différenciation. En revanche, chez les insectes, le rôle de l'hormone stéroïdienne 20-hydroxyecdysone (ou ecdysone) dans ce processus de régression et de remodelage des dendrites au cours du développement et de la métamorphose a été clairement mis en évidence (Weeks et Levine, 1990; Weeks, 2003). De façon intéressante, un des gènes cibles de l'ecdysone chez les insectes est l'homologue de ROR α (*DHR3* chez *Drosophila melanogaster* (Koelle *et al.*, 1992), *CHR3* chez *Caenorhabditis elegans* (Kostrouch *et al.*, 1995) et *MHR3* chez *Manduca sexta* (Palli *et al.*, 1992)). On peut donc émettre l'hypothèse que le mécanisme d'action de ROR α dans le remodelage des neurites soit conservé entre les insectes et la souris, et supposer que les effets de l'ecdysone chez ces insectes soient médié par l'homologue de ROR α . De plus, chez les mammifères, l'hormone thyroïdienne est considérée comme l'équivalent fonctionnel de l'ecdysone, les deux hormones étant notamment responsables de l'induction de la métamorphose chez les insectes et chez les amphibiens respectivement (pour revues, voir Tata, 1993, 2000, 2005). Ainsi, l'interaction connue de la voie de l'ecdysone mettant en jeu *DHR3* pourrait également exister chez les mammifères et mettre en jeu la TH et ROR α .

III. L'ETAPE DE REGRESSION DENDRITIQUE EST-ELLE LIEE A UNE APOPTOSE DEVELOPPEMENTALE DES CELLULES DE PURKINJE? CONSEQUENCES CHEZ LE MUTANT *STAGGERER*

Les études réalisées nous ont permis de mettre en évidence un rôle de ROR α à la fois dans la survie des neurones par le contrôle du stress oxydant induit par des agents pro-apoptotiques et dans la différenciation précoce des cellules de Purkinje.

Des études indirectes suggèrent que la mort des cellules de Purkinje chez les mutants homozygotes *staggerer* intervient entre P0 et P5 (Vogel *et al.*, 2000). Cette période correspond à la période pendant laquelle interviendrait l'apoptose développementale des cellules de Purkinje, située entre P1 et P7 (Zanjani *et al.*, 1996; Dusart *et al.*, 1997; Ghoumari *et al.*, 2000; Kitao *et al.*, 2004; Marin-Teva *et al.*, 2004). De plus, nous avons montré que ROR α contrôle les étapes précoces de différenciation dendritique, plus particulièrement l'étape de régression qui semble intervenir, d'après nos observations, *in vivo* chez la souris entre P0 et P6. ROR α ne semble plus jouer de rôle crucial dans la différenciation à P7, puisque sa surexpression dans des cultures organotypiques à P7 n'a pas influencé la croissance dendritique.

De cette analyse, il apparaît que la période située entre la naissance et P7, est particulièrement critique pour le développement du cervelet chez la souris. ROR α est impliqué d'une manière intrinsèque dans la survie des cellules de Purkinje et dans leur différenciation pendant cette période. De plus ROR α contrôle - via la régulation de l'expression du signal mitogène Shh par les cellules de Purkinje (Gold *et al.*, 2003) - la prolifération des précurseurs des grains. ROR α intervient donc de façon cruciale à plusieurs étapes-clés du développement du cervelet, en agissant sur la survie et la différenciation des cellules de Purkinje, et en contrôlant la genèse des grains qui vont constituer la majorité des cellules du cervelet.

Les études réalisées dans les cultures organotypiques ont mis en évidence le rôle crucial de ROR α dans la régression des dendrites. La surexpression de ROR α dans des Purkinje bipolaires (stade I) entraîne l'accélération de la différenciation dendritique jusqu'au stade où la cellule présente son arborisation caractéristique (stade IV). Cependant la

surexpression de ROR α dans des cellules de Purkinje de stade III (stade où elles présentent des protrusions périssomatiques) n'a pas mis en évidence de rôle de ROR α dans la différenciation dendritique. Cependant, il n'a pas été possible d'étudier l'effet de la surexpression de ROR α dans des cellules de Purkinje en stade II (stade cellule étoilée), car la mise en culture des tranches entraîne la mort des cellules de Purkinje qui sont en stade II à ce stade. En effet, *in vivo*, la différenciation des cellules de Purkinje n'est pas synchrone, la régression des dendrites intervient entre P0 et P7, avec une proportion très importante de cellules en stade II à P3 et P5. Nous avons observé que les cellules de Purkinje en stade II au moment de la mise en culture ne survivent pas dans les tranches après 24 heures de culture. Les cellules de Purkinje qui survivent dans les cultures réalisées à P3 et P5 sont celles qui sont encore en stade I ou celles qui sont déjà en stade III de différenciation. Ces observations montrent que les cellules de Purkinje dans le stade II sont particulièrement sensibles à la mise en culture. L'étape de régression des dendrites semble donc être une période critique pour leur survie, qui pourrait se traduire *in vivo* par une plus grande susceptibilité à divers stress tels qu'une carence en facteurs trophiques et conduire ainsi à l'apoptose développementale pour un certain nombre d'entre elles. Dans cette étape critique, on peut donc supposer que l'expression de ROR α est indispensable à la différenciation correcte des cellules de Purkinje et permet leur survie en exerçant un rôle neuroprotecteur anti-oxydant.

CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

Au cours de cette thèse, nous avons mis en évidence le rôle crucial de ROR α dans les processus de différenciation et de survie neuronale.

Nous avons en particulier révélé le rôle qu'exerce ROR α au cours des étapes précoces de la différenciation dendritique des cellules de Purkinje pendant le développement, et le rôle neuroprotecteur que ROR α pouvait conférer en contrôlant le stress oxydatif dans les neurones via une surexpression des enzymes Gpx1 et Prx6.

L'analyse du phénotype des mutants hétérozygotes *staggerer* suggère que ROR α joue un rôle important dans la survie et la différenciation des cellules de Purkinje au cours du vieillissement. Il serait intéressant d'étudier le rôle de ROR α pendant le vieillissement normal, en modifiant son expression: une surexpression de ROR α *in vivo* par infection d'un vecteur lentiviral exprimant ROR α permettrait de déterminer si ce récepteur nucléaire influence la survie des cellules de Purkinje au cours du vieillissement. On peut également envisager une stratégie inverse d'inhibition de l'expression de ROR α au cours du vieillissement normal (à l'aide de l'infection *in vivo* d'un vecteur lentiviral exprimant un sh-RNA qui cible spécifiquement l'expression de ROR α).

Il en est de même pour l'hypothèse du rôle de ROR α dans la différenciation des cellules de Purkinje au cours du vieillissement: il serait intéressant d'étudier l'influence d'une surexpression ou d'une diminution de son expression spécifiquement au cours du vieillissement.

Nous avons mis en évidence le rôle de ROR α dans la différenciation, cependant, les mécanismes par lesquels ROR α exerce cette action restent à déterminer. En effet, il est vraisemblable que ROR α agisse dans les cellules en contrôlant spécifiquement l'expression de gènes cibles. L'étude du transcriptome du cervelet des souris *staggerer* à E17 (Gold *et al.*, 2003) a mis en évidence le contrôle de la prolifération des cellules granulaires par ROR α , et a mis en évidence un certain nombre de gènes impliqués dans l'homéostasie calcique. Il sera, à l'avenir, intéressant de déterminer quels sont les mécanismes génétiques sous-jacents aux rôles connus de ROR α .

Les résultats obtenus au cours de cette thèse concernent l'isoforme ROR α 1. En effet, la surexpression de ROR α 4 n'exerce pas de rôle neuroprotecteur dans les neurones corticaux, et l'effet de ROR α 4 dans la différenciation des cellules de Purkinje n'a pas été testé. Il sera également intéressant de comprendre les différences d'activité, entre les isoformes ROR α 1 et

ROR α 4, dont le patron d'expression est similaire dans le cervelet. Peut-être ces différences d'activité sont-elles liées à des différences de gènes cibles contrôlés par l'une ou l'autre isoforme? En effet, les différences entre ces isoformes résident dans la partie N-Terminale de la protéine, dans le domaine modulateur, qui est impliqué dans la reconnaissance spécifique de la séquence riche en A/T en amont du site consensus AGGTCA du RORE.

Nous avons vu que ROR α est exprimé dans le cervelet dès E14; cependant son action dans la différenciation dendritique semble concerner les cellules de Purkinje avant P7, alors qu'il continue d'être exprimé après cette période. Il est vraisemblable que son activité soit régulée par d'autres facteurs, tels que Rev-Erb α . Ainsi, connaître la façon dont sont régulées l'expression et l'activité de ROR α reste également une question cruciale.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Ackerman SL, Kozak LP, Przyborski SA, Rund LA, Boyer BB, Knowles BB (1997) The mouse rostral cerebellar malformation gene encodes an UNC-5-like protein. *Nature* 386:838-842.
- Adcock KH, Metzger F, Kapfhammer JP (2004) Purkinje cell dendritic tree development in the absence of excitatory neurotransmission and of brain-derived neurotrophic factor in organotypic slice cultures. *Neuroscience* 127:137-145.
- Adelmant G, Begue A, Stehelin D, Laudet V (1996) A functional Rev-erb alpha responsive element located in the human Rev-erb alpha promoter mediates a repressing activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:3553-3558.
- Adler V, Yin Z, Tew KD, Ronai Z (1999a) Role of redox potential and reactive oxygen species in stress signaling. *Oncogene* 18:6104-6111.
- Adler V, Yin Z, Fuchs SY, Benezra M, Rosario L, Tew KD, Pincus MR, Sardana M, Henderson CJ, Wolf CR, Davis RJ, Ronai Z (1999b) Regulation of JNK signaling by GSTp. *Embo J* 18:1321-1334.
- Aguilar MJ, Kamoshita S, Landing BH, Boder E, Sedgwick RP (1968) Pathological observations in ataxia-telangiectasia. A report of five cases. *J Neuropathol Exp Neurol* 27:659-676.
- Akashi M, Takumi T (2005) The orphan nuclear receptor RORalpha regulates circadian transcription of the mammalian core-clock Bmal1. *Nat Struct Mol Biol* 12:441-448.
- Altman J (1972a) Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat. II. Phases in the maturation of Purkinje cells and of the molecular layer. *J Comp Neurol* 145:399-463.
- Altman J (1972b) Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat. 3. Maturation of the components of the granular layer. *J Comp Neurol* 145:465-513.
- Altman J, Anderson WJ (1972) Experimental reorganization of the cerebellar cortex. I. Morphological effects of elimination of all microneurons with prolonged x-irradiation started at birth. *J Comp Neurol* 146:355-406.
- Altman J, Bayer S (1997) *Cerebellar System in Relation to its Evolution, Structure, and Functions.*: CRC Press, Boca Raton.
- Amenta F, Cavalotta D, Del Valle ME, Mancini M, Sabbatini M, Torres JM, Vega JA (1994) Calbindin D-28k immunoreactivity in the rat cerebellar cortex: age-related changes. *Neurosci Lett* 178:131-134.
- Anderson GW (2001) Thyroid hormones and the brain. *Front Neuroendocrinol* 22:1-17.
- Andre E, Gawlas K, Becker-Andre M (1998a) A novel isoform of the orphan nuclear receptor RORbeta is specifically expressed in pineal gland and retina. *Gene* 216:277-283.
- Andre E, Conquet F, Steinmayr M, Stratton SC, Porciatti V, Becker-Andre M (1998b) Disruption of retinoid-related orphan receptor beta changes circadian behavior, causes retinal degeneration and leads to vacillans phenotype in mice. *Embo J* 17:3867-3877.
- Anglade P, Vyas S, Javoy-Agid F, Herrero MT, Michel PP, Marquez J, Mouatt-Prigent A, Ruberg M, Hirsch EC, Agid Y (1997) Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease. *Histol Histopathol* 12:25-31.
- Arin DM, Bauman M, Kemper TL (1991) The distribution of purkinje cell loss in the cerebellum in autism. *Neurology* 41:307.
- Armengol JA, Sotelo C (1991) Early dendritic development of Purkinje cells in the rat cerebellum. A light and electron microscopic study using axonal tracing in 'in vitro' slices. *Brain Res Dev Brain Res* 64:95-114.
- Armstrong CL, Hawkes R (2000) Pattern formation in the cerebellar cortex. *Biochem Cell Biol* 78:551-562.
- Ashwell K (1990) Microglia and cell death in the developing mouse cerebellum. *Brain Res Dev Brain Res* 55:219-230.
- Atkins GB, Hu X, Guenther MG, Rachez C, Freedman LP, Lazar MA (1999) Coactivators for the orphan nuclear receptor RORalpha. *Mol Endocrinol* 13:1550-1557.
- Austin S, Medvedev A, Yan ZH, Adachi H, Hirose T, Jetten AM (1998) Induction of the nuclear orphan receptor RORgamma during adipocyte differentiation of D1 and 3T3-L1 cells. *Cell Growth Differ* 9:267-276.

B

- Bakalian A, Corman B, Delhaye-Bouchaud N, Mariani J (1991) Quantitative analysis of the Purkinje cell population during extreme ageing in the cerebellum of the Wistar/Louvain rat. *Neurobiol Aging* 12:425-430.
- Baptista CA, Hatten ME, Blazeski R, Mason CA (1994) Cell-cell interactions influence survival and differentiation of purified Purkinje cells in vitro. *Neuron* 12:243-260.
- Barclay J, Balaguero N, Mione M, Ackerman SL, Letts VA, Brodbeck J, Canti C, Meir A, Page KM, Kusumi K, Perez-Reyes E, Lander ES, Frankel WN, Gardiner RM, Dolphin AC, Rees M (2001) Ducky mouse phenotype of epilepsy and ataxia is associated with mutations in the *Cacna2d2* gene and decreased calcium channel current in cerebellar Purkinje cells. *J Neurosci* 21:6095-6104.
- Barnett YA, King CM (1995) An investigation of antioxidant status, DNA repair capacity and mutation as a function of age in humans. *Mutat Res* 338:115-128.
- Barnhart BC, Alappat EC, Peter ME (2003) The CD95 type I/type II model. *Semin Immunol* 15:185-193.
- Barzilai A, Rotman G, Shiloh Y (2002) ATM deficiency and oxidative stress: a new dimension of defective response to DNA damage. *DNA Repair (Amst)* 1:3-25.
- Bauman M, Kemper TL (1985) Histoanatomic observations of the brain in early infantile autism. *Neurology* 35:866-874.
- Baurle J, Grusser-Cornehls U (1994) Axonal torpedoes in cerebellar Purkinje cells of two normal mouse strains during aging. *Acta Neuropathol (Berl)* 88:237-245.
- Becker-Andre M, Andre E, DeLamarter JF (1993) Identification of nuclear receptor mRNAs by RT-PCR amplification of conserved zinc-finger motif sequences. *Biochem Biophys Res Commun* 194:1371-1379.
- Becker-Andre M, Wiesenberg I, Schaeren-Wiemers N, Andre E, Missbach M, Saurat JH, Carlberg C (1994) Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. *J Biol Chem* 269:28531-28534.
- Beckman KB, Ames BN (1998) The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* 78:547-581.
- Behl C, Davis JB, Lesley R, Schubert D (1994) Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity. *Cell* 77:817-827.
- Berry M, Bradley P (1976) The growth of the dendritic trees of Purkinje cells in the cerebellum of the rat. *Brain Res* 112:1-35.
- Berry M, McConnell P, Sievers J (1980) Dendritic growth and the control of neuronal form. *Curr Top Dev Biol* 15 Pt 1:67-101.
- Bertossi M, Roncali L, Mancini L, Ribatti D, Nico B (1986) Process of differentiation of cerebellar Purkinje neurons in the chick embryo. *Anat Embryol (Berl)* 175:25-34.
- Besnard S, Silvestre JS, Duriez M, Bakouche J, Lemaigre-Dubreuil Y, Mariani J, Levy BI, Tedgui A (2001) Increased ischemia-induced angiogenesis in the staggerer mouse, a mutant of the nuclear receptor RORalpha. *Circ Res* 89:1209-1215.
- Besnard S, Bakouche J, Lemaigre-Dubreuil Y, Mariani J, Tedgui A, Henrion D (2002a) Smooth muscle dysfunction in resistance arteries of the staggerer mouse, a mutant of the nuclear receptor RORalpha. *Circ Res* 90:820-825.
- Besnard S, Heymes C, Merval R, Rodriguez M, Galizzi JP, Boutin JA, Mariani J, Tedgui A (2002b) Expression and regulation of the nuclear receptor RORalpha in human vascular cells. *FEBS Lett* 511:36-40.
- Bickford PC, Gould T, Briederick L, Chadman K, Pollock A, Young D, Shukitt-Hale B, Joseph J (2000) Antioxidant-rich diets improve cerebellar physiology and motor learning in aged rats. *Brain Res* 866:211-217.
- Bitsch F, Aichholz R, Kallen J, Geisse S, Fournier B, Schlaeppli JM (2003) Identification of natural ligands of retinoic acid receptor-related orphan receptor alpha ligand-binding domain expressed in Sf9 cells--a mass spectrometry approach. *Anal Biochem* 323:139-149.
- Blatt GJ, Eisenman LM (1985) A qualitative and quantitative light microscopic study of the inferior olivary complex in the adult staggerer mutant mouse. *J Neurogenet* 2:51-66.

- Boder E (1975) Ataxia-telangiectasia: some historic, clinical and pathologic observations. *Birth Defects Orig Artic Ser* 11:255-270.
- Bohr VA, Anson RM (1995) DNA damage, mutation and fine structure DNA repair in aging. *Mutat Res* 338:25-34.
- Bois-Joyeux B, Chauvet C, Nacer-Cherif H, Bergeret W, Mazure N, Giguere V, Laudet V, Danan JL (2000) Modulation of the far-upstream enhancer of the rat alpha-fetoprotein gene by members of the ROR alpha, Rev-erb alpha, and Rev-erb beta groups of monomeric orphan nuclear receptors. *DNA Cell Biol* 19:589-599.
- Bordji K, Grillasca JP, Gouze JN, Magdalou J, Schohn H, Keller JM, Bianchi A, Dauca M, Netter P, Terlain B (2000) Evidence for the presence of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and gamma and retinoid Z receptor in cartilage. PPARgamma activation modulates the effects of interleukin-1beta on rat chondrocytes. *J Biol Chem* 275:12243-12250.
- Boukhtouche F, Mariani J, Tedgui A (2004) The "CholesteROR" protective pathway in the vascular system. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:637-643.
- Bourguet W, Ruff M, Chambon P, Gronemeyer H, Moras D (1995) Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR-alpha. *Nature* 375:377-382.
- Boveris A, Chance B (1973) The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* 134:707-716.
- Boveris A, Cadenas E, Stoppani AO (1976) Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochem J* 156:435-444.
- Bradley P, Berry M (1978) The Purkinje cell dendritic tree in mutant mouse cerebellum. A quantitative Golgi study of Weaver and Staggerer mice. *Brain Res* 142:135-141.
- Brooks VB, Thach WT (1981) Cerebellar control of posture and movement. In: *Handbook of physiology: Sec. 1. The nervous system*, V.B Brooks Edition, pp 180-204. Bethesda, Maryland: American Physiological Society.
- Brown RH, Jr. (1995) Superoxide dismutase in familial amyotrophic lateral sclerosis: models for gain of function. *Curr Opin Neurobiol* 5:841-846.
- Butler JE, Kadonaga JT (2002) The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes Dev* 16:2583-2592.
- Buttke TM, Sandstrom PA (1994) Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol Today* 15:7-10.

C

- Caddy KW, Herrup K (1990) Studies of the dendritic tree of wild-type cerebellar Purkinje cells in *lurcher* chimeric mice. *J Comp Neurol* 297:121-131.
- Camakaris J, Mann JR, Danks DM (1979) Copper metabolism in mottled mouse mutants: copper concentrations in tissues during development. *Biochem J* 180:597-604.
- Carlberg C, Hooft van Huijsduijnen R, Staple JK, DeLamararter JF, Becker-Andre M (1994) RZR α s, a new family of retinoid-related orphan receptors that function as both monomers and homodimers. *Mol Endocrinol* 8:757-770.
- Carmeliet P (2000) Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 6:389-395.
- Carney GE, Wade AA, Sapra R, Goldstein ES, Bender M (1997) DHR3, an ecdysone-inducible early-late gene encoding a *Drosophila* nuclear receptor, is required for embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:12024-12029.
- Carro E, Trejo JL, Busiguina S, Torres-Aleman I (2001) Circulating insulin-like growth factor I mediates the protective effects of physical exercise against brain insults of different etiology and anatomy. *J Neurosci* 21:5678-5684.
- Caston J, Delhaye-Bouchaud N, Mariani J (1995) Motor behavior of heterozygous staggerer mutant (+/sg) versus normal (+/+) mice during aging. *Behav Brain Res* 72:97-102.
- Caston J, Hilber P, Chianale C, Mariani J (2003) Effect of training on motor abilities of heterozygous staggerer mutant (Rora(+)/Rora(sg)) mice during aging. *Behav Brain Res* 141:35-42.

- Caston J, Chianale C, Mariani J (2004) Spatial memory of heterozygous staggerer (Rora(+)/Rora(sg)) versus normal (Rora(+)/Rora(+)) mice during aging. *Behav Genet* 34:319-324.
- Chambers DM, Peters J, Abbott CM (1998) The lethal mutation of the mouse wasted (wst) is a deletion that abolishes expression of a tissue-specific isoform of translation elongation factor 1alpha, encoded by the Eef1a2 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:4463-4468.
- Chance B, Sies H, Boveris A (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59:527-605.
- Chauvet C, Bois-Joyeux B, Berra E, Pouyssegur J, Danan JL (2004) The gene encoding human retinoic acid-receptor-related orphan receptor alpha is a target for hypoxia-inducible factor 1. *Biochem J* 384:79-85.
- Chauvet C, Bois-Joyeux B, Fontaine C, Gervois P, Bernard MA, Staels B, Danan JL (2005) The gene encoding fibrinogen-beta is a target for retinoic acid receptor-related orphan receptor alpha. *Mol Endocrinol* 19:2517-2526.
- Chawla A, Lazar MA (1993) Induction of Rev-ErbA alpha, an orphan receptor encoded on the opposite strand of the alpha-thyroid hormone receptor gene, during adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 268:16265-16269.
- Chelly J, Tumer Z, Tonnesen T, Petterson A, Ishikawa-Brush Y, Tommerup N, Horn N, Monaco AP (1993) Isolation of a candidate gene for Menkes disease that encodes a potential heavy metal binding protein. *Nat Genet* 3:14-19.
- Chen JD, Evans RM (1995) A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* 377:454-457.
- Chomez P, Neveu I, Mansen A, Kiesler E, Larsson L, Vennstrom B, Arenas E (2000) Increased cell death and delayed development in the cerebellum of mice lacking the rev-erbA(alpha) orphan receptor. *Development* 127:1489-1498.
- Chrysis D, Calikoglu AS, Ye P, D'Ercole AJ (2001) Insulin-like growth factor-I overexpression attenuates cerebellar apoptosis by altering the expression of Bcl family proteins in a developmentally specific manner. *J Neurosci* 21:1481-1489.
- Chu K, Zingg HH (1999) Activation of the mouse oxytocin promoter by the orphan receptor RORalpha. *J Mol Endocrinol* 23:337-346.
- Clarke PG (1990) Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol (Berl)* 181:195-213.
- Cohen G, Farooqui R, Kesler N (1997) Parkinson disease: a new link between monoamine oxidase and mitochondrial electron flow. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:4890-4894.
- Cohen-Cory S, Elliott RC, Dreyfus CF, Black IB (1993) Depolarizing influences increase low-affinity NGF receptor gene expression in cultured Purkinje neurons. *Exp Neurol* 119:165-175.
- Collingwood TN, Urnov FD, Wolffe AP (1999) Nuclear receptors: coactivators, corepressors and chromatin remodeling in the control of transcription. *J Mol Endocrinol* 23:255-275.
- Crepel F, Delhaye-Bouchaud N, Guastavino JM, Sampaio I (1980) Multiple innervation of cerebellar Purkinje cells by climbing fibres in staggerer mutant mouse. *Nature* 283:483-484.
- Crispino L, Bullock TH (1984) Cerebellum mediates modality-specific modulation of sensory responses of midbrain and forebrain in rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:2917-2920.
- Croteau DL, Bohr VA (1997) Repair of oxidative damage to nuclear and mitochondrial DNA in mammalian cells. *J Biol Chem* 272:25409-25412.
- Cunningham RP (1997) DNA repair: caretakers of the genome? *Curr Biol* 7:R576-579.

D

- Dahmane N, Ruiz-i-Altaba A (1999) Sonic hedgehog regulates the growth and patterning of the cerebellum. *Development* 126:3089-3100.
- Daniel PT, Schulze-Osthoff K, Belka C, Guner D (2003) Guardians of cell death: the Bcl-2 family proteins. *Essays Biochem* 39:73-88.

- Danielian PS, White R, Lees JA, Parker MG (1992) Identification of a conserved region required for hormone dependent transcriptional activation by steroid hormone receptors. *Embo J* 11:1025-1033.
- D'Arcangelo G, Miao GG, Chen SC, Soares HD, Morgan JI, Curran T (1995) A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant *reeler*. *Nature* 374:719-723.
- Deby C, Goutier R (1990) New perspectives on the biochemistry of superoxide anion and the efficiency of superoxide dismutases. *Biochem Pharmacol* 39:399-405.
- Delerive P, Monte D, Dubois G, Trottein F, Fruchart-Najib J, Mariani J, Fruchart JC, Staels B (2001) The orphan nuclear receptor ROR alpha is a negative regulator of the inflammatory response. *EMBO Rep* 2:42-48.
- Delerive P, Chin WW, Suen CS (2002) Identification of *Reverb(alpha)* as a novel ROR(alpha) target gene. *J Biol Chem* 277:35013-35018.
- Desagher S, Martinou JC (2000) Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol* 10:369-377.
- Dino MR, Nunzi MG, Anelli R, Mugnaini E (2000) Unipolar brush cells of the vestibulocerebellum: afferents and targets. *Prog Brain Res* 124:123-137.
- Doughty ML, Lohof A, Campana A, Delhaye-Bouchaud N, Mariani J (1998) Neurotrophin-3 promotes cerebellar granule cell exit from the EGL. *Eur J Neurosci* 10:3007-3011.
- Doulazmi M, Frederic F, Lemaigre-Dubreuil Y, Hadj-Sahraoui N, Delhaye-Bouchaud N, Mariani J (1999) Cerebellar Purkinje cell loss during life span of the heterozygous *staggerer* mouse (*Rora(+)/Rora(sg)*) is gender-related. *J Comp Neurol* 411:267-273.
- Doulazmi M, Frederic F, Capone F, Becker-Andre M, Delhaye-Bouchaud N, Mariani J (2001) A comparative study of Purkinje cells in two RORalpha gene mutant mice: *staggerer* and RORalpha(-/-). *Brain Res Dev Brain Res* 127:165-174.
- Downes M, Carozzi AJ, Muscat GE (1995) Constitutive expression of the orphan receptor, *Rev-erbA alpha*, inhibits muscle differentiation and abrogates the expression of the *myoD* gene family. *Mol Endocrinol* 9:1666-1678.
- Downes M, Burke LJ, Bailey PJ, Muscat GE (1996) Two receptor interaction domains in the corepressor, *N-CoR/RIP13*, are required for an efficient interaction with *Rev-erbA alpha* and *RVR*: physical association is dependent on the E region of the orphan receptors. *Nucleic Acids Res* 24:4379-4386.
- Doyle J, Ren X, Lennon G, Stubbs L (1997) Mutations in the *Cacn11a4* calcium channel gene are associated with seizures, cerebellar degeneration, and ataxia in tottering and leaner mutant mice. *Mamm Genome* 8:113-120.
- Droge W (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82:47-95.
- Dulabon L, Olson EC, Taglienti MG, Eisenhuth S, McGrath B, Walsh CA, Kreidberg JA, Anton ES (2000) *Reelin* binds $\alpha3\beta1$ integrin and inhibits neuronal migration. *Neuron* 27:33-44.
- Dumas B, Harding HP, Choi HS, Lehmann KA, Chung M, Lazar MA, Moore DD (1994) A new orphan member of the nuclear hormone receptor superfamily closely related to *Rev-Erb*. *Mol Endocrinol* 8:996-1005.
- Dumont A, Hehner SP, Hofmann TG, Ueffing M, Droge W, Schmitz ML (1999) Hydrogen peroxide-induced apoptosis is CD95-independent, requires the release of mitochondria-derived reactive oxygen species and the activation of NF-kappaB. *Oncogene* 18:747-757.
- Dusart I, Airaksinen MS, Sotelo C (1997) Purkinje cell survival and axonal regeneration are age dependent: an in vitro study. *J Neurosci* 17:3710-3726.
- Dussault I, Giguere V (1997) Differential regulation of the *N-myc* proto-oncogene by ROR alpha and RVR, two orphan members of the superfamily of nuclear hormone receptors. *Mol Cell Biol* 17:1860-1867.
- Dussault I, Fawcett D, Matthyssen A, Bader JA, Giguere V (1998) Orphan nuclear receptor ROR alpha-deficient mice display the cerebellar defects of *staggerer*. *Mech Dev* 70:147-153.

E

- Eccles J, Ito M, Szentagothai J (1967) *The cerebellum as neuronal machine*, Springer-Verlag Edition. Berlin.
- Edelman GM, Chuong CM (1982) Embryonic to adult conversion of neural cell adhesion molecules in normal and staggerer mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79:7036-7040.
- Egea PF, Klaholz BP, Moras D (2000a) Ligand-protein interactions in nuclear receptors of hormones. *FEBS Lett* 476:62-67.
- Egea PF, Mitschler A, Rochel N, Ruff M, Chambon P, Moras D (2000b) Crystal structure of the human RXR α ligand-binding domain bound to its natural ligand: 9-cis retinoic acid. *Embo J* 19:2592-2601.
- Ekinci FJ, Malik KU, Shea TB (1999) Activation of the L voltage-sensitive calcium channel by mitogen-activated protein (MAP) kinase following exposure of neuronal cells to beta-amyloid. MAP kinase mediates beta-amyloid-induced neurodegeneration. *J Biol Chem* 274:30322-30327.
- Emery P, Reppert SM (2004) A rhythmic Ror. *Neuron* 43:443-446.
- Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S (1998) A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391:43-50.
- Endo T, Kobayashi S, Onaya T (1985) Parvalbumin in rat cerebrum, cerebellum and retina during postnatal development. *Neurosci Lett* 60:279-282.
- Evans RM (1988) The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240:889-895.

F

- Fan H, Favero M, Vogel MW (2001) Elimination of Bax expression in mice increases cerebellar purkinje cell numbers but not the number of granule cells. *J Comp Neurol* 436:82-91.
- Fattoretti P, Bertoni-Freddari C, Caselli U, Paoloni R, Meier-Ruge W (1998) Impaired succinic dehydrogenase activity of rat Purkinje cell mitochondria during aging. *Mech Ageing Dev* 101:175-182.
- Fernandez-Gonzalez A, La Spada AR, Treadaway J, Higdon JC, Harris BS, Sidman RL, Morgan JI, Zuo J (2002) Purkinje cell degeneration (pcd) phenotypes caused by mutations in the axotomy-induced gene, *Nna1*. *Science* 295:1904-1906.
- Fletcher CF, Lutz CM, O'Sullivan TN, Shaughnessy JD, Jr., Hawkes R, Frankel WN, Copeland NG, Jenkins NA (1996) Absence epilepsy in tottering mutant mice is associated with calcium channel defects. *Cell* 87:607-617.
- Flohe L, Brigelius-Flohe R, Saliou C, Traber MG, Packer L (1997) Redox regulation of NF-kappa B activation. *Free Radic Biol Med* 22:1115-1126.
- Forman BM, Chen J, Blumberg B, Kliewer SA, Henshaw R, Ong ES, Evans RM (1994) Cross-talk among ROR alpha 1 and the Rev-erb family of orphan nuclear receptors. *Mol Endocrinol* 8:1253-1261.
- Forrest D, Hallbook F, Persson H, Vennstrom B (1991) Distinct functions for thyroid hormone receptors alpha and beta in brain development indicated by differential expression of receptor genes. *Embo J* 10:269-275.
- Fox C, Snider E (1967) *The cerebellum* (Vol.25), Elsevier Edition. Amsterdam / London / New York.
- Fraichard A, Chassande O, Plateroti M, Roux JP, Trouillas J, Dehay C, Legrand C, Gauthier K, Kedinger M, Malaval L, Rousset B, Samarut J (1997) The T3R alpha gene encoding a thyroid hormone receptor is essential for post-natal development and thyroid hormone production. *Embo J* 16:4412-4420.
- France-Lanord V, Brugg B, Michel PP, Agid Y, Ruberg M (1997) Mitochondrial free radical signal in ceramide-dependent apoptosis: a putative mechanism for neuronal death in Parkinson's disease. *J Neurochem* 69:1612-1621.
- Freedman LP (1992) Anatomy of the steroid receptor zinc finger region. *Endocr Rev* 13:129-145.

- Freeman BA, Crapo JD (1982) Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 47:412-426.
- Fridovich I (1978) The biology of oxygen radicals. *Science* 201:875-880.
- Fridovich I (1995) Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 64:97-112.
- Fujita S, Shimada M, Nakamura T (1966) H3-thymidine autoradiographic studies on the cell proliferation and differentiation in the external and the internal granular layers of the mouse cerebellum. *J Comp Neurol* 128:191-208.

G

- Gabbita SP, Butterfield DA, Hensley K, Shaw W, Carney JM (1997) Aging and caloric restriction affect mitochondrial respiration and lipid membrane status: an electron paramagnetic resonance investigation. *Free Radic Biol Med* 23:191-201.
- Gallagher E, Howell BW, Soriano P, Cooper JA, Hawkes R (1998) Cerebellar abnormalities in the disabled (*mdab1-1*) mouse. *J Comp Neurol* 402:238-251.
- Gawlas K, Stunnenberg HG (2000) Differential binding and transcriptional behaviour of two highly related orphan receptors, ROR alpha(4) and ROR beta(1). *Biochim Biophys Acta* 1494:236-241.
- Gervois P, Chopin-Delannoy S, Fadel A, Dubois G, Kosykh V, Fruchart JC, Najib J, Laudet V, Staels B (1999) Fibrates increase human REV-ERBalpha expression in liver via a novel peroxisome proliferator-activated receptor response element. *Mol Endocrinol* 13:400-409.
- Ghetti B, Norton J, Triarhou LC (1987) Nerve cell atrophy and loss in the inferior olivary complex of "Purkinje cell degeneration" mutant mice. *J Comp Neurol* 260:409-422.
- Ghosh A, Carnahan J, Greenberg ME (1994) Requirement for BDNF in activity-dependent survival of cortical neurons. *Science* 263:1618-1623.
- Ghoumari AM, Wehrle R, Bernard O, Sotelo C, Dusart I (2000) Implication of Bcl-2 and Caspase-3 in age-related Purkinje cell death in murine organotypic culture: an in vitro model to study apoptosis. *Eur J Neurosci* 12:2935-2949.
- Ghoumari AM, Wehrle R, De Zeeuw CI, Sotelo C, Dusart I (2002) Inhibition of protein kinase C prevents Purkinje cell death but does not affect axonal regeneration. *J Neurosci* 22:3531-3542.
- Ghoumari AM, Dusart I, El-Etr M, Tronche F, Sotelo C, Schumacher M, Baulieu EE (2003) Mifepristone (RU486) protects Purkinje cells from cell death in organotypic slice cultures of postnatal rat and mouse cerebellum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:7953-7958.
- Giguere V (1999) Orphan nuclear receptors: from gene to function. *Endocr Rev* 20:689-725.
- Giguere V, Tini M, Flock G, Ong E, Evans RM, Otulakowski G (1994) Isoform-specific amino-terminal domains dictate DNA-binding properties of ROR alpha, a novel family of orphan hormone nuclear receptors. *Genes Dev* 8:538-553.
- Giguere V, McBroom LD, Flock G (1995a) Determinants of target gene specificity for ROR alpha 1: monomeric DNA binding by an orphan nuclear receptor. *Mol Cell Biol* 15:2517-2526.
- Giguere V, Beatty B, Squire J, Copeland NG, Jenkins NA (1995b) The orphan nuclear receptor ROR alpha (RORA) maps to a conserved region of homology on human chromosome 15q21-q22 and mouse chromosome 9. *Genomics* 28:596-598.
- Gilmore EC, Herrup K (2000) Cortical development: receiving reelin. *Curr Biol* 10:162-166.
- Giulivi C, Pacifici RE, Davies KJ (1994) Exposure of hydrophobic moieties promotes the selective degradation of hydrogen peroxide-modified hemoglobin by the multicatalytic proteinase complex, proteasome. *Arch Biochem Biophys* 311:329-341.
- Glass CK (1994) Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers. *Endocr Rev* 15:391-407.
- Glass CK, Rosenfeld MG (2000) The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev* 14:121-141.
- Glickman MH, Ciechanover A (2002) The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* 82:373-428.

- Gold DA, Baek SH, Schork NJ, Rose DW, Larsen DD, Sachs BD, Rosenfeld MG, Hamilton BA (2003) RORalpha coordinates reciprocal signaling in cerebellar development through sonic hedgehog and calcium-dependent pathways. *Neuron* 40:1119-1131.
- Goldowitz D, Hamre K (1998) The cells and molecules that make a cerebellum. *Trends Neurosci* 21:375-382.
- Good PF, Werner P, Hsu A, Olanow CW, Perl DP (1996) Evidence of neuronal oxidative damage in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 149:21-28.
- Gothe S, Wang Z, Ng L, Kindblom JM, Barros AC, Ohlsson C, Vennstrom B, Forrest D (1999) Mice devoid of all known thyroid hormone receptors are viable but exhibit disorders of the pituitary-thyroid axis, growth, and bone maturation. *Genes Dev* 13:1329-1341.
- Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, Bornert JM, Argos P, Chambon P (1986) Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* 320:134-139.
- Greiner EF, Kirfel J, Greschik H, Dorflinger U, Becker P, Mercep A, Schule R (1996) Functional analysis of retinoid Z receptor beta, a brain-specific nuclear orphan receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:10105-10110.
- Gronemeyer H, Laudet V (1995) Transcription factors 3: nuclear receptors. *Protein Profile* 2:1173-1308.
- Grune T, Reinheckel T, Davies KJ (1997) Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. *Faseb J* 11:526-534.
- Guastavino JM (1983) Constraint of the mother with pups restores some aspects of the maternal behavior of mutant staggerer mice. *Physiol Behav* 30:771-774.
- Guillaumond F, Dardente H, Giguere V, Cermakian N (2005) Differential control of Bmal1 circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors. *J Biol Rhythms* 20:391-403.

H

- Hadj-Sahraoui N, Frederic F, Zanjani H, Herrup K, Delhay-Bouchaud N, Mariani J (1997) Purkinje cell loss in heterozygous staggerer mutant mice during aging. *Brain Res Dev Brain Res* 98:1-8.
- Hadj-Sahraoui N, Frederic F, Zanjani H, Delhay-Bouchaud N, Herrup K, Mariani J (2001) Progressive atrophy of cerebellar Purkinje cell dendrites during aging of the heterozygous staggerer mouse (Rora(+/-sg)). *Brain Res Dev Brain Res* 126:201-209.
- Hallonet M, Alvarado-Mallart RM (1997) The chick/quail chimeric system: a model for early cerebellar development. *Perspect Dev Neurobiol* 5:17-31.
- Hallonet ME, Le Douarin NM (1993) Tracing neuroepithelial cells of the mesencephalic and metencephalic alar plates during cerebellar ontogeny in quail-chick chimaeras. *Eur J Neurosci* 5:1145-1155.
- Hamburger V, Levi-Montalcini R (1949) Proliferation, differentiation and degeneration in the spinal ganglia of the chick embryo under normal and experimental conditions. *J Exp Zool* 111:457-502.
- Hamilton BA, Frankel WN, Kerrebrock AW, Hawkins TL, FitzHugh W, Kusumi K, Russell LB, Mueller KL, van Berkel V, Birren BW, Kruglyak L, Lander ES (1996) Disruption of the nuclear hormone receptor RORalpha in staggerer mice. *Nature* 379:736-739.
- Harding HP, Lazar MA (1993) The orphan receptor Rev-ErbA alpha activates transcription via a novel response element. *Mol Cell Biol* 13:3113-3121.
- Harding HP, Lazar MA (1995) The monomer-binding orphan receptor Rev-Erb represses transcription as a dimer on a novel direct repeat. *Mol Cell Biol* 15:4791-4802.
- Harding HP, Atkins GB, Jaffe AB, Seo WJ, Lazar MA (1997) Transcriptional activation and repression by RORalpha, an orphan nuclear receptor required for cerebellar development. *Mol Endocrinol* 11:1737-1746.
- Harris J, Moreno S, Shaw G, Mugnaini E (1993) Unusual neurofilament composition in cerebellar unipolar brush neurons. *J Neurocytol* 22:1039-1059.

- Harris JM, Lau P, Chen SL, Muscat GE (2002) Characterization of the retinoid orphan-related receptor-alpha coactivator binding interface: a structural basis for ligand-independent transcription. *Mol Endocrinol* 16:998-1012.
- Hashimoto K, Curty FH, Borges PP, Lee CE, Abel ED, Elmquist JK, Cohen RN, Wondisford FE (2001) An unliganded thyroid hormone receptor causes severe neurological dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:3998-4003.
- Hatten ME (1999) Central nervous system neuronal migration. *Annu Rev Neurosci* 22:511-539.
- Hatten ME, Messer A (1978) Postnatal cerebellar cells from staggerer mutant mice express embryonic cell surface characteristic. *Nature* 276:504-506.
- Hatten ME, Heintz N (1995) Mechanisms of neural patterning and specification in the developing cerebellum. *Annu Rev Neurosci* 18:385-408.
- Hatten ME, Alder J, Zimmerman K, Heintz N (1997) Genes involved in cerebellar cell specification and differentiation. *Curr Opin Neurobiol* 7:40-47.
- Hawkes R, Eisenman LM (1997) Stripes and zones: the origins of regionalization of the adult cerebellum. *Perspect Dev Neurobiol* 5:95-105.
- Haydar TF, Kuan CY, Flavell RA, Rakic P (1999) The role of cell death in regulating the size and shape of the mammalian forebrain. *Cereb Cortex* 9:621-626.
- He Q, Huang Y, Sheikh MS (2004) Bax deficiency affects caspase-2 activation during ultraviolet radiation-induced apoptosis. *Oncogene* 23:1321-1325.
- He YW, Deftos ML, Ojala EW, Bevan MJ (1998) RORgamma t, a novel isoform of an orphan receptor, negatively regulates Fas ligand expression and IL-2 production in T cells. *Immunity* 9:797-806.
- He YW, Beers C, Deftos ML, Ojala EW, Forbush KA, Bevan MJ (2000) Down-regulation of the orphan nuclear receptor ROR gamma t is essential for T lymphocyte maturation. *J Immunol* 164:5668-5674.
- Hendelman WJ, Aggerwal AS (1980) The Purkinje neuron: I. A Golgi study of its development in the mouse and in culture. *J Comp Neurol* 193:1063-1079.
- Henderson CE (1996) Programmed cell death in the developing nervous system. *Neuron* 17:579-585.
- Hensley K, Butterfield DA, Hall N, Cole P, Subramaniam R, Mark R, Mattson MP, Markesbery WR, Harris ME, Aksenov M, et al. (1996) Reactive oxygen species as causal agents in the neurotoxicity of the Alzheimer's disease-associated amyloid beta peptide. *Ann N Y Acad Sci* 786:120-134.
- Herrup K (1983) Role of staggerer gene in determining cell number in cerebellar cortex. I. Granule cell death is an indirect consequence of staggerer gene action. *Brain Res* 313:267-274.
- Herrup K, Kuemerle B (1997) The compartmentalization of the cerebellum. *Annu Rev Neurosci* 20:61-90.
- Heuer H, Mason CA (2003) Thyroid hormone induces cerebellar Purkinje cell dendritic development via the thyroid hormone receptor alpha1. *J Neurosci* 23:10604-10612.
- Higami Y, Shimokawa I (2000) Apoptosis in the aging process. *Cell Tissue Res* 301:125-132.
- Hirai H, Launey T (2000) The regulatory connection between the activity of granule cell NMDA receptors and dendritic differentiation of cerebellar Purkinje cells. *J Neurosci* 20:5217-5224.
- Hirose T, Smith RJ, Jetten AM (1994) ROR gamma: the third member of ROR/RZR orphan receptor subfamily that is highly expressed in skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 205:1976-1983.
- Ho YS, Magnenat JL, Bronson RT, Cao J, Gargano M, Sugawara M, Funk CD (1997) Mice deficient in cellular glutathione peroxidase develop normally and show no increased sensitivity to hyperoxia. *J Biol Chem* 272:16644-16651.
- Horinouchi K, Erlich S, Perl DP, Ferlinz K, Bisgaier CL, Sandhoff K, Desnick RJ, Stewart CL, Schuchman EH (1995) Acid sphingomyelinase deficient mice: a model of types A and B Niemann-Pick disease. *Nat Genet* 10:288-293.
- Horlein AJ, Naar AM, Heinzl T, Torchia J, Gloss B, Kurokawa R, Ryan A, Kamei Y, Soderstrom M, Glass CK, et al. (1995) Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* 377:397-404.

- Howell BW, Hawkes R, Soriano P, Cooper JA (1997) Neuronal position in the developing brain is regulated by mouse disabled-1. *Nature* 389:733-737.
- Hunot S, Brugg B, Ricard D, Michel PP, Muriel MP, Ruberg M, Faucheux BA, Agid Y, Hirsch EC (1997) Nuclear translocation of NF-kappaB is increased in dopaminergic neurons of patients with parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:7531-7536.

I

- Ichikawa Y, Goto J, Hattori M, Toyoda A, Ishii K, Jeong SY, Hashida H, Masuda N, Ogata K, Kasai F, Hirai M, Maciel P, Rouleau GA, Sakaki Y, Kanazawa I (2001) The genomic structure and expression of MJD, the Machado-Joseph disease gene. *J Hum Genet* 46:413-422.
- Ino H (2004) Immunohistochemical characterization of the orphan nuclear receptor ROR alpha in the mouse nervous system. *J Histochem Cytochem* 52:311-323.
- Ito M (1982) Cerebellar control of the vestibulo-ocular reflex--around the flocculus hypothesis. *Annu Rev Neurosci* 5:275-296.
- Iwata M, Hirano A, French JH (1979) Degeneration of the cerebellar system in X-chromosome-linked copper malabsorption. *Ann Neurol* 5:542-549.

J

- Jetten AM (2004) Recent advances in the mechanisms of action and physiological functions of the retinoid-related orphan receptors (RORs). *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 3:395-412.
- Jetten AM, Kurebayashi S, Ueda E (2001) The ROR nuclear orphan receptor subfamily: critical regulators of multiple biological processes. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 69:205-247.
- Jin P, Sun Y, Grabowski GA (1998) Role of Sp proteins and RORalpha in transcription regulation of murine prosaposin. *J Biol Chem* 273:13208-13216.
- Jin P, Sun Y, Grabowski GA (2001) In vivo roles of RORalpha and Sp4 in the regulation of murine prosaposin gene. *DNA Cell Biol* 20:781-789.
- Joseph JA, Denisova NA, Bielinski D, Fisher DR, Shukitt-Hale B (2000) Oxidative stress protection and vulnerability in aging: putative nutritional implications for intervention. *Mech Ageing Dev* 116:141-153.

K

- Kallen J, Schlaeppi JM, Bitsch F, Delhon I, Fournier B (2004) Crystal structure of the human RORalpha Ligand binding domain in complex with cholesterol sulfate at 2.2 Å. *J Biol Chem* 279:14033-14038.
- Kallen JA, Schlaeppi JM, Bitsch F, Geisse S, Geiser M, Delhon I, Fournier B (2002) X-ray structure of the hRORalpha LBD at 1.63 Å: structural and functional data that cholesterol or a cholesterol derivative is the natural ligand of RORalpha. *Structure (Camb)* 10:1697-1707.
- Kandel E, Schwartz J, Jessel T (1991) *Principles of neural science*, 3rd Edition: Appleton and Lange.
- Kane CD, Means AR (2000) Activation of orphan receptor-mediated transcription by Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase IV. *Embo J* 19:691-701.
- Kapfhammer JP (2004) Cellular and molecular control of dendritic growth and development of cerebellar Purkinje cells. *Prog Histochem Cytochem* 39:131-182.
- Keller JN, Kindy MS, Holtsberg FW, St Clair DK, Yen HC, Germeyer A, Steiner SM, Bruce-Keller AJ, Hutchins JB, Mattson MP (1998) Mitochondrial manganese superoxide dismutase prevents neural apoptosis and reduces ischemic brain injury: suppression of peroxynitrite production, lipid peroxidation, and mitochondrial dysfunction. *J Neurosci* 18:687-697.

- Kenney AM, Cole MD, Rowitch DH (2003) Nmyc upregulation by sonic hedgehog signaling promotes proliferation in developing cerebellar granule neuron precursors. *Development* 130:15-28.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26:239-257.
- Keynes R, Lumsden A (1990) Segmentation and the origin of regional diversity in the vertebrate central nervous system. *Neuron* 4:1-9.
- Kimoto Y, Tohyama M, Satoh K, Sakumoto T, Takahashi Y, Shimizu N (1981) Fine structure of rat cerebellar noradrenaline terminals as visualized by potassium permanganate 'in situ perfusion' fixation method. *Neuroscience* 6:47-58.
- Kitao Y, Hashimoto K, Matsuyama T, Iso H, Tamatani T, Hori O, Stern DM, Kano M, Ozawa K, Ogawa S (2004) ORP150/HSP12A regulates Purkinje cell survival: a role for endoplasmic reticulum stress in cerebellar development. *J Neurosci* 24:1486-1496.
- Koelle MR, Talbot WS, Segraves WA, Bender MT, Cherbas P, Hogness DS (1991) The *Drosophila* EcR gene encodes an ecdysone receptor, a new member of the steroid receptor superfamily. *Cell* 67:59-77.
- Koelle MR, Segraves WA, Hogness DS (1992) DHR3: a *Drosophila* steroid receptor homolog. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:6167-6171.
- Koibuchi N, Chin WW (1998) ROR alpha gene expression in the perinatal rat cerebellum: ontogeny and thyroid hormone regulation. *Endocrinology* 139:2335-2341.
- Koibuchi N, Liu Y, Fukuda H, Takeshita A, Yen PM, Chin WW (1999) ROR alpha augments thyroid hormone receptor-mediated transcriptional activation. *Endocrinology* 140:1356-1364.
- Koibuchi N, Yamaoka S, Chin WW (2001) Effect of altered thyroid status on neurotrophin gene expression during postnatal development of the mouse cerebellum. *Thyroid* 11:205-210.
- Kopmels B, Mariani J, Delhaye-Bouchaud N, Audibert F, Fradelizi D, Wollman EE (1992) Evidence for a hyperexcitability state of staggerer mutant mice macrophages. *J Neurochem* 58:192-199.
- Korneliussen HK (1968a) On the ontogenetic development of the cerebellum (nuclei, fissures, and cortex) of the rat, with special reference to regional variations in corticogenesis. *J Hirnforsch* 10:379-412.
- Korneliussen HK (1968b) On the morphology and subdivision of the cerebellar nuclei of the rat. *J Hirnforsch* 10:109-122.
- Kostrouch Z, Kostrouchova M, Rall JE (1995) Steroid/thyroid hormone receptor genes in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:156-159.
- Kuno-Murata M, Koibuchi N, Fukuda H, Murata M, Chin WW (2000) Augmentation of thyroid hormone receptor-mediated transcription by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase type IV. *Endocrinology* 141:2275-2278.
- Kurebayashi S, Sumitani S, Kasayama S, Jetten AM, Hirose T (2001) TNF-alpha inhibits 3T3-L1 adipocyte differentiation without downregulating the expression of C/EBPbeta and delta. *Endocr J* 48:249-253.

L

- Laine J, Axelrad H (1994) The candelabrum cell: a new interneuron in the cerebellar cortex. *J Comp Neurol* 339:159-173.
- Laine J, Axelrad H (1998) Lugaro cells target basket and stellate cells in the cerebellar cortex. *Neuroreport* 9:2399-2403.
- Lala DS, Rice DA, Parker KL (1992) Steroidogenic factor I, a key regulator of steroidogenic enzyme expression, is the mouse homolog of fushi tarazu-factor I. *Mol Endocrinol* 6:1249-1258.
- Lander HM, Milbank AJ, Tauras JM, Hajjar DP, Hempstead BL, Schwartz GD, Kraemer RT, Mirza UA, Chait BT, Burk SC, Quilliam LA (1996) Redox regulation of cell signalling. *Nature* 381:380-381.
- Landis DM, Sidman RL (1978) Electron microscopic analysis of postnatal histogenesis in the cerebellar cortex of staggerer mutant mice. *J Comp Neurol* 179:831-863.

- Lannoo MJ, Brochu G, Maler L, Hawkes R (1991) Zebrin II immunoreactivity in the rat and in the weakly electric teleost *Eigenmannia* (gymnotiformes) reveals three modes of Purkinje cell development. *J Comp Neurol* 310:215-233.
- Larkfors L, Lindsay RM, Alderson RF (1996) Characterization of the responses of Purkinje cells to neurotrophin treatment. *J Neurochem* 66:1362-1373.
- Larramendi EM, Victor T (1967) Synapses on the Purkinje cell spines in the mouse. An electronmicroscopic study. *Brain Res* 5:15-30.
- Lassus P, Opitz-Araya X, Lazebnik Y (2002) Requirement for caspase-2 in stress-induced apoptosis before mitochondrial permeabilization. *Science* 297:1352-1354.
- Lau P, Bailey P, Dowhan DH, Muscat GE (1999) Exogenous expression of a dominant negative RORalpha1 vector in muscle cells impairs differentiation: RORalpha1 directly interacts with p300 and myoD. *Nucleic Acids Res* 27:411-420.
- Lauder JM (1978) Effects of early hypo- and hyperthyroidism on development of rat cerebellar cortex. IV. The parallel fibers. *Brain Res* 142:25-39.
- Laudet V, Hanni C, Coll J, Catzeflis F, Stehelin D (1992) Evolution of the nuclear receptor gene superfamily. *Embo J* 11:1003-1013.
- Le Douarin NM (1982) *The neural crest*, Cambridge University Press Edition. Cambridge.
- Letts VA, Felix R, Biddlecome GH, Arikath J, Mahaffey CL, Valenzuela A, Bartlett FS, 2nd, Mori Y, Campbell KP, Frankel WN (1998) The mouse stargazer gene encodes a neuronal Ca²⁺-channel gamma subunit. *Nat Genet* 19:340-347.
- Levi-Montalcini R (1949) The development of the acoustico-vestibular centers in the chick embryo in the absence of the afferent root fibers and of descending fiber tracts. *J Comp Neurol* 91:209-241, illust, incl 203 pl.
- Levine B, Klionsky DJ (2004) Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* 6:463-477.
- Libby P (2002) Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420:868-874.
- Lind U, Nilsson T, McPheat J, Stromstedt PE, Bamberg K, Balendran C, Kang D (2005) Identification of the human ApoAV gene as a novel RORalpha target gene. *Biochem Biophys Res Commun* 330:233-241.
- Lindholm D, Castren E, Tsoulfas P, Kolbeck R, Berzaghi Mda P, Leingartner A, Heisenberg CP, Tessarollo L, Parada LF, Thoenen H (1993) Neurotrophin-3 induced by tri-iodothyronine in cerebellar granule cells promotes Purkinje cell differentiation. *J Cell Biol* 122:443-450.
- Liu X, Zou H, Slaughter C, Wang X (1997) DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 89:175-184.

M

- Mamontova A, Seguret-Mace S, Esposito B, Chanial C, Bouly M, Delhaye-Bouchaud N, Luc G, Staels B, Duverger N, Mariani J, Tedgui A (1998) Severe atherosclerosis and hypoalphalipoproteinemia in the staggerer mouse, a mutant of the nuclear receptor RORalpha. *Circulation* 98:2738-2743.
- Mangelsdorf DJ, Evans RM (1995) The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 83:841-850.
- Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM (1995) The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83:835-839.
- Mann JR, Camakaris J, Danks DM, Walliczek EG (1979) Copper metabolism in mottled mouse mutants: copper therapy of brindled (Mobr) mice. *Biochem J* 180:605-612.
- Mariani J, Changeux JP (1980) Multiple innervation of Purkinje cells by climbing fibers in the cerebellum of the adult staggerer mutant mouse. *J Neurobiol* 11:41-50.
- Mariani J, Changeux JP (1981a) Ontogenesis of olivocerebellar relationships. II. Spontaneous activity of inferior olivary neurons and climbing fiber-mediated activity of cerebellar Purkinje cells in developing rats. *J Neurosci* 1:703-709.

- Mariani J, Changeux JP (1981b) Ontogenesis of olivocerebellar relationships. I. Studies by intracellular recordings of the multiple innervation of Purkinje cells by climbing fibers in the developing rat cerebellum. *J Neurosci* 1:696-702.
- Marin F, Puelles L (1995) Morphological fate of rhombomeres in quail/chick chimeras: a segmental analysis of hindbrain nuclei. *Eur J Neurosci* 7:1714-1738.
- Marin-Teva JL, Dusart I, Colin C, Gervais A, van Rooijen N, Mallat M (2004) Microglia promote the death of developing Purkinje cells. *Neuron* 41:535-547.
- Mark RJ, Lovell MA, Markesbery WR, Uchida K, Mattson MP (1997) A role for 4-hydroxynonenal, an aldehydic product of lipid peroxidation, in disruption of ion homeostasis and neuronal death induced by amyloid beta-peptide. *J Neurochem* 68:255-264.
- Martinou JC, Frankowski H, Missotten M, Martinou I, Potier L, Dubois-Dauphin M (1994) Bcl-2 and neuronal selection during development of the nervous system. *J Physiol Paris* 88:209-211.
- Mason CA, Gregory E (1984) Postnatal maturation of cerebellar mossy and climbing fibers: transient expression of dual features on single axons. *J Neurosci* 4:1715-1735.
- Mason CA, Christakos S, Catalano SM (1990) Early climbing fiber interactions with Purkinje cells in the postnatal mouse cerebellum. *J Comp Neurol* 297:77-90.
- Massa EM, Giulivi C (1993) Alkoxy and methyl radical formation during cleavage of tert-butyl hydroperoxide by a mitochondrial membrane-bound, redox active copper pool: an EPR study. *Free Radic Biol Med* 14:559-565.
- Matsui T (1996) Differential activation of the murine laminin B1 gene promoter by RAR alpha, ROR alpha, and AP-1. *Biochem Biophys Res Commun* 220:405-410.
- Matsui T (1997) Transcriptional regulation of a Purkinje cell-specific gene through a functional interaction between ROR alpha and RAR. *Genes Cells* 2:263-272.
- Matsui T, Sashihara S, Oh Y, Waxman SG (1995) An orphan nuclear receptor, mROR alpha, and its spatial expression in adult mouse brain. *Brain Res Mol Brain Res* 33:217-226.
- Matysiak-Scholze U, Nehls M (1997) The structural integrity of ROR alpha isoforms is mutated in staggerer mice: cerebellar coexpression of ROR alpha1 and ROR alpha4. *Genomics* 43:78-84.
- McBroom LD, Flock G, Giguere V (1995) The nonconserved hinge region and distinct amino-terminal domains of the ROR alpha orphan nuclear receptor isoforms are required for proper DNA bending and ROR alpha-DNA interactions. *Mol Cell Biol* 15:796-808.
- Means AR (2000) Regulatory cascades involving calmodulin-dependent protein kinases. *Mol Endocrinol* 14:4-13.
- Medvedev A, Yan ZH, Hirose T, Giguere V, Jetten AM (1996) Cloning of a cDNA encoding the murine orphan receptor RZR/ROR gamma and characterization of its response element. *Gene* 181:199-206.
- Meier P, Finch A, Evan G (2000) Apoptosis in development. *Nature* 407:796-801.
- Menkes JH, Alter M, Steigleder GK, Weakley DR, Sung JH (1962) A sex-linked recessive disorder with retardation of growth, peculiar hair, and focal cerebral and cerebellar degeneration. *Pediatrics* 29:764-779.
- Mercer JF, Livingston J, Hall B, Paynter JA, Begy C, Chandrasekharappa S, Lockhart P, Grimes A, Bhave M, Siemieniak D, et al. (1993) Isolation of a partial candidate gene for Menkes disease by positional cloning. *Nat Genet* 3:20-25.
- Messer A (1988) Thyroxine injections do not cause premature induction of thymidine kinase in sg/sg mice. *J Neurochem* 51:888-891.
- Messer A, Hatch K (1984) Persistence of cerebellar thymidine kinase in staggerer and hypothyroid mutants. *J Neurogenet* 1:239-248.
- Messer A, Plummer-Siegard J, Eisenberg B (1990) Staggerer mutant mouse Purkinje cells do not contain detectable calmodulin mRNA. *J Neurochem* 55:293-302.
- Meyer T, Kneissel M, Mariani J, Fournier B (2000) In vitro and in vivo evidence for orphan nuclear receptor RORalpha function in bone metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:9197-9202.
- Miale IL, Sidman RL (1961) An autoradiographic analysis of histogenesis in the mouse cerebellum. *Exp Neurol* 4:277-296.

- Missbach M, Jagher B, Sigg I, Nayeri S, Carlberg C, Wiesenberg I (1996) Thiazolidine diones, specific ligands of the nuclear receptor retinoid Z receptor/retinoid acid receptor-related orphan receptor alpha with potent antiarthritic activity. *J Biol Chem* 271:13515-13522.
- Miyajima N, Horiuchi R, Shibuya Y, Fukushige S, Matsubara K, Toyoshima K, Yamamoto T (1989) Two erbA homologs encoding proteins with different T3 binding capacities are transcribed from opposite DNA strands of the same genetic locus. *Cell* 57:31-39.
- Mohn AR, Feddersen RM, Nguyen MS, Koller BH (1997) Phenotypic analysis of mice lacking the highly abundant Purkinje cell- and bipolar neuron-specific PCP2 protein. *Mol Cell Neurosci* 9:63-76.
- Monnier Z, Bahjaoui-Bouhaddi M, Bride J, Bride M, Math F, Propper A (1999) Structural and immunohistological modifications in olfactory bulb of the staggerer mutant mouse. *Biol Cell* 91:29-44.
- Monteiro HP, Stern A (1996) Redox modulation of tyrosine phosphorylation-dependent signal transduction pathways. *Free Radic Biol Med* 21:323-333.
- Moraitis AN, Giguere V (1999) Transition from monomeric to homodimeric DNA binding by nuclear receptors: identification of RevErbAalpha determinants required for RORalpha homodimer complex formation. *Mol Endocrinol* 13:431-439.
- Moraitis AN, Giguere V (2003) The co-repressor hairless protects RORalpha orphan nuclear receptor from proteasome-mediated degradation. *J Biol Chem* 278:52511-52518.
- Moraitis AN, Giguere V, Thompson CC (2002) Novel mechanism of nuclear receptor corepressor interaction dictated by activation function 2 helix determinants. *Mol Cell Biol* 22:6831-6841.
- Morara S, van der Want JJ, de Weerd H, Provini L, Rosina A (2001) Ultrastructural analysis of climbing fiber-Purkinje cell synaptogenesis in the rat cerebellum. *Neuroscience* 108:655-671.
- Morte B, Manzano J, Scanlan T, Vennstrom B, Bernal J (2002) Deletion of the thyroid hormone receptor alpha 1 prevents the structural alterations of the cerebellum induced by hypothyroidism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:3985-3989.
- Mount HT, Dreyfus CF, Black IB (1993) Purkinje cell survival is differentially regulated by metabotropic and ionotropic excitatory amino acid receptors. *J Neurosci* 13:3173-3179.
- Mount HT, Dreyfus CF, Black IB (1994a) Neurotrophin-3 selectively increases cultured Purkinje cell survival. *Neuroreport* 5:2497-2500.
- Mount HT, Dreyfus CF, Black IB (1994b) Muscarinic stimulation promotes cultured Purkinje cell survival: a role for acetylcholine in cerebellar development? *J Neurochem* 63:2065-2073.
- Mugnaini E, Dahl AL (1975) Mode of distribution of aminergic fibers in the cerebellar cortex of the chicken. *J Comp Neurol* 162:417-432.
- Mugnaini E, Floris A (1994) The unipolar brush cell: a neglected neuron of the mammalian cerebellar cortex. *J Comp Neurol* 339:174-180.

N

- Nagata S (2005) DNA degradation in development and programmed cell death. *Annu Rev Immunol* 23:853-875.
- Nicholson JL, Altman J (1972a) The effects of early hypo- and hyperthyroidism on the development of the rat cerebellar cortex. II. Synaptogenesis in the molecular layer. *Brain Res* 44:25-36.
- Nicholson JL, Altman J (1972b) Synaptogenesis in the rat cerebellum: effects of early hypo- and hyperthyroidism. *Science* 176:530-532.
- Nicholson JL, Altman J (1972c) The effects of early hypo- and hyperthyroidism on the development of rat cerebellar cortex. I. Cell proliferation and differentiation. *Brain Res* 44:13-23.
- Nixon RA, Cataldo AM (1995) The endosomal-lysosomal system of neurons: new roles. *Trends Neurosci* 18:489-496.
- Nohl H, Hegner D (1978) Do mitochondria produce oxygen radicals in vivo? *Eur J Biochem* 82:563-567.
- Norman DJ, Feng L, Cheng SS, Gubbay J, Chan E, Heintz N (1995) The *lurcher* gene induces apoptotic death in cerebellar Purkinje cells. *Development* 121:1183-1193.

Nuclear Receptors Nomenclature Committee (1999) A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell* 97:161-163.

O

- Oppenheim RW (1981) Cell death of motoneurons in the chick embryo spinal cord. V. Evidence on the role of cell death and neuromuscular function in the formation of specific peripheral connections. *J Neurosci* 1:141-151.
- Oppenheim RW (1991) Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci* 14:453-501.
- Oppenheimer JH, Schwartz HL (1997) Molecular basis of thyroid hormone-dependent brain development. *Endocr Rev* 18:462-475.
- Orr H (1887) Contribution to the embryology of the Lizards. *J Morphol* 1:311-372.
- Ortiz MA, Piedrafita FJ, Pfahl M, Maki R (1995) TOR: a new orphan receptor expressed in the thymus that can modulate retinoid and thyroid hormone signals. *Mol Endocrinol* 9:1679-1691.
- Otterbach B, Stoffel W (1995) Acid sphingomyelinase-deficient mice mimic the neurovisceral form of human lysosomal storage disease (Niemann-Pick disease). *Cell* 81:1053-1061.

P

- Pacifici RE, Davies KJ (1991) Protein, lipid and DNA repair systems in oxidative stress: the free-radical theory of aging revisited. *Gerontology* 37:166-180.
- Palay S, Chan-Palay V (1974) *Cerebellar cortex: Cytology and Organization*, Springer-Verlag Edition, Berlin.
- Palli SR, Hiruma K, Riddiford LM (1992) An ecdysteroid-inducible *Manduca* gene similar to the *Drosophila* DHR3 gene, a member of the steroid hormone receptor superfamily. *Dev Biol* 150:306-318.
- Palmer RM, Ashton DS, Moncada S (1988) Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333:664-666.
- Paravicini G, Steinmayr M, Andre E, Becker-Andre M (1996) The metastasis suppressor candidate nucleotide diphosphate kinase NM23 specifically interacts with members of the ROR/RZR nuclear orphan receptor subfamily. *Biochem Biophys Res Commun* 227:82-87.
- Patil N, Cox DR, Bhat D, Faham M, Myers RM, Peterson AS (1995) A potassium channel mutation in weaver mice implicates membrane excitability in granule cell differentiation. *Nat Genet* 11:126-129.
- Paula-Barbosa MM, Ruela C, Tavares MA, Pontes C, Saraiva A, Cruz C (1983) Cerebellar cortex ultrastructure in ataxia-telangiectasia. *Ann Neurol* 13:297-302.
- Pena LA, Fuks Z, Kolesnick R (1997) Stress-induced apoptosis and the sphingomyelin pathway. *Biochem Pharmacol* 53:615-621.
- Pentchev PG, Comly ME, Kruth HS, Patel S, Proestel M, Weintroub H (1986a) The cholesterol storage disorder of the mutant BALB/c mouse. A primary genetic lesion closely linked to defective esterification of exogenously derived cholesterol and its relationship to human type C Niemann-Pick disease. *J Biol Chem* 261:2772-2777.
- Pentchev PG, Kruth HS, Comly ME, Butler JD, Vanier MT, Wenger DA, Patel S (1986b) Type C Niemann-Pick disease. A parallel loss of regulatory responses in both the uptake and esterification of low density lipoprotein-derived cholesterol in cultured fibroblasts. *J Biol Chem* 261:16775-16780.
- Piette J, Piret B, Bonizzi G, Schoonbroodt S, Merville MP, Legrand-Poels S, Bours V (1997) Multiple redox regulation in NF-kappaB transcription factor activation. *Biol Chem* 378:1237-1245.
- Pike CJ, Ramezan-Arab N, Cotman CW (1997) Beta-amyloid neurotoxicity in vitro: evidence of oxidative stress but not protection by antioxidants. *J Neurochem* 69:1601-1611.

- Potter GB, Beaudoin GM, 3rd, DeRenzo CL, Zarach JM, Chen SH, Thompson CC (2001) The hairless gene mutated in congenital hair loss disorders encodes a novel nuclear receptor corepressor. *Genes Dev* 15:2687-2701.
- Pratt WB (1993) The role of heat shock proteins in regulating the function, folding, and trafficking of the glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* 268:21455-21458.
- Preitner N, Damiola F, Lopez-Molina L, Zakany J, Duboule D, Albrecht U, Schibler U (2002) The orphan nuclear receptor REV-ERB α controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell* 110:251-260.

Q

- Quillet-Mary A, Jaffrezou JP, Mansat V, Bordier C, Naval J, Laurent G (1997) Implication of mitochondrial hydrogen peroxide generation in ceramide-induced apoptosis. *J Biol Chem* 272:21388-21395.

R

- Rakic P, Sidman RL (1973) Organization of cerebellar cortex secondary to deficit of granule cells in weaver mutant mice. *J Comp Neurol* 152:133-161.
- Ramón y Cajal S (1888) Sobre las fibras nerviosas de la capa molecular del cerebelo. *Rev Trimest Histol* 2:33-41.
- Ramón y Cajal S (1890) A propos de certains éléments bipolaires du cervelet avec quelques détails nouveaux sur l'évolution des fibres cérébelleuses. *Int Mschr Anat Physiol* 7:447-468.
- Ramón y Cajal S (1891) Sur la structure de l'écorce cérébrale de quelques mammifères. *Cellule* 7:125-176.
- Ramón y Cajal S (1911) *Histologie du Système Nerveux de l'Homme et des Vertébrés*, Maloine Edition. Paris.
- Ramón y Cajal S (1926) Sur les fibres moussues et quelques points douteux de la texture de l'écorce cérébelleuse. *Trab Lab Invest Biol Univ Madrid* 24:215-251.
- Raspe E, Duez H, Gervois P, Fievet C, Fruchart JC, Besnard S, Mariani J, Tedgui A, Staels B (2001) Transcriptional regulation of apolipoprotein C-III gene expression by the orphan nuclear receptor ROR α . *J Biol Chem* 276:2865-2871.
- Raspe E, Duez H, Mansen A, Fontaine C, Fievet C, Fruchart JC, Vennstrom B, Staels B (2002) Identification of Rev-erb α as a physiological repressor of apoC-III gene transcription. *J Lipid Res* 43:2172-2179.
- Rastinejad F, Perlmann T, Evans RM, Sigler PB (1995) Structural determinants of nuclear receptor assembly on DNA direct repeats. *Nature* 375:203-211.
- Reaume AG, Elliott JL, Hoffman EK, Kowall NW, Ferrante RJ, Siwek DF, Wilcox HM, Flood DG, Beal MF, Brown RH, Jr., Scott RW, Snider WD (1996) Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat Genet* 13:43-47.
- Reppert SM, Weaver DR (2002) Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 418:935-941.
- Retnakaran R, Flock G, Giguere V (1994) Identification of RVR, a novel orphan nuclear receptor that acts as a negative transcriptional regulator. *Mol Endocrinol* 8:1234-1244.
- Rivett AJ (1990) Intracellular protein degradation. *Essays Biochem* 25:39-81.
- Robinson-Rechavi M, Escriva Garcia H, Laudet V (2003) The nuclear receptor superfamily. *J Cell Sci* 116:585-586.
- Robyr D, Wolffe AP, Wahli W (2000) Nuclear hormone receptor coregulators in action: diversity for shared tasks. *Mol Endocrinol* 14:329-347.
- Roeder RG (1996) The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biochem Sci* 21:327-335.

Rondi-Reig L, Caston J, Delhaye-Bouchaud N, Mariani J (2000) Cerebellar functions: A behavioral neurogenetic perspective. In: Syllabus on behavioral genetics, I. Edition, pp 201-216: CRC Press.

S

- Sakamoto H, Ukena K, Tsutsui K (2002) Dendritic spine formation in response to progesterone synthesized de novo in the developing Purkinje cell in rats. *Neurosci Lett* 322:111-115.
- Sakamoto H, Mezaki Y, Shikimi H, Ukena K, Tsutsui K (2003) Dendritic growth and spine formation in response to estrogen in the developing Purkinje cell. *Endocrinology* 144:4466-4477.
- Sashihara S, Felts PA, Waxman SG, Matsui T (1996) Orphan nuclear receptor ROR alpha gene: isoform-specific spatiotemporal expression during postnatal development of brain. *Brain Res Mol Brain Res* 42:109-117.
- Sato TK, Panda S, Miraglia LJ, Reyes TM, Rudic RD, McNamara P, Naik KA, FitzGerald GA, Kay SA, Hogenesch JB (2004) A functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock. *Neuron* 43:527-537.
- Satoh T, Sakai N, Enokido Y, Uchiyama Y, Hatanaka H (1996) Survival factor-insensitive generation of reactive oxygen species induced by serum deprivation in neuronal cells. *Brain Res* 733:9-14.
- Schaeren-Wiemers N, Andre E, Kapfhammer JP, Becker-Andre M (1997) The expression pattern of the orphan nuclear receptor RORbeta in the developing and adult rat nervous system suggests a role in the processing of sensory information and in circadian rhythm. *Eur J Neurosci* 9:2687-2701.
- Scharffetter-Kochanek K, Wlaschek M, Brenneisen P, Schauen M, Blaudschun R, Wenk J (1997) UV-induced reactive oxygen species in photocarcinogenesis and photoaging. *Biol Chem* 378:1247-1257.
- Schilling K, Dickinson MH, Connor JA, Morgan JI (1991) Electrical activity in cerebellar cultures determines Purkinje cell dendritic growth patterns. *Neuron* 7:891-902.
- Schrader M, Danielsson C, Wiesenberg I, Carlberg C (1996) Identification of natural monomeric response elements of the nuclear receptor RZR/ROR. They also bind COUP-TF homodimers. *J Biol Chem* 271:19732-19736.
- Schulze-Osthoff K, Schenk H, Droge W (1995) Effects of thioredoxin on activation of transcription factor NF-kappa B. *Methods Enzymol* 252:253-264.
- Schwartz LM, Osborne BA (1995) Cell death. *Methods Cell Biol* 46:xv-xviii.
- Schweichel JU, Merker HJ (1973) The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology* 7:253-266.
- Selimi F, Lohof AM, Heitz S, Lalouette A, Jarvis CI, Bailly Y, Mariani J (2003) Lurcher GRID2-induced death and depolarization can be dissociated in cerebellar Purkinje cells. *Neuron* 37:813-819.
- Selkoe DJ (1994) Cell biology of the amyloid beta-protein precursor and the mechanism of Alzheimer's disease. *Annu Rev Cell Biol* 10:373-403.
- Sen CK, Packer L (1996) Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *Faseb J* 10:709-720.
- Shamburek RD, Pentchev PG, Zech LA, Blanchette-Mackie J, Carstea ED, VandenBroek JM, Cooper PS, Neufeld EB, Phair RD, Brewer HB, Jr., Brady RO, Schwartz CC (1997) Intracellular trafficking of the free cholesterol derived from LDL cholesteryl ester is defective in vivo in Niemann-Pick C disease: insights on normal metabolism of HDL and LDL gained from the NP-C mutation. *J Lipid Res* 38:2422-2435.
- Sheldon M, Rice DS, D'Arcangelo G, Yoneshima H, Nakajima K, Mikoshiba K, Howell BW, Cooper JA, Goldowitz D, Curran T (1997) Scrambler and yotari disrupt the disabled gene and produce a reeler-like phenotype in mice. *Nature* 389:730-733.
- Shojaeian H, Delhaye-Bouchaud N, Mariani J (1985) Decreased number of cells in the inferior olivary nucleus of the developing staggerer mouse. *Brain Res* 353:141-146.

- Shojaeian H, Delhaye-Bouchaud N, Mariani J (1988) Stability of inferior olivary neurons in rodents. I. Moderate cell loss in adult Purkinje cell degeneration mutant mouse. *Brain Res* 466:211-218.
- Sidman RL, Lane PV, Dickie MM (1962) staggerer, a new mutation in the mouse affecting the cerebellum. *Science* 136:610-612.
- Sirlin JL (1956) Vacillans, a neurological mutant in the house mouse linked with brown. *J Genet* 54:42-48.
- Sladek FM, Ruse MD, Jr., Nepomuceno L, Huang SM, Stallcup MR (1999) Modulation of transcriptional activation and coactivator interaction by a splicing variation in the F domain of nuclear receptor hepatocyte nuclear factor 4alpha1. *Mol Cell Biol* 19:6509-6522.
- Sladek R, Bader JA, Giguere V (1997) The orphan nuclear receptor estrogen-related receptor alpha is a transcriptional regulator of the human medium-chain acyl coenzyme A dehydrogenase gene. *Mol Cell Biol* 17:5400-5409.
- Slater AF, Stefan C, Nobel I, van den Dobbelsteen DJ, Orrenius S (1995) Signalling mechanisms and oxidative stress in apoptosis. *Toxicol Lett* 82-83:149-153.
- Smith MA, Sayre LM, Monnier VM, Perry G (1995) Radical AGEing in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* 18:172-176.
- Smith MA, Harris PL, Sayre LM, Perry G (1997) Iron accumulation in Alzheimer disease is a source of redox-generated free radicals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:9866-9868.
- Smith MA, Perry G, Richey PL, Sayre LM, Anderson VE, Beal MF, Kowall N (1996) Oxidative damage in Alzheimer's. *Nature* 382:120-121.
- Snider WD, Lichtman JW (1996) Are neurotrophins synaptotrophins? *Mol Cell Neurosci* 7:433-442.
- Sohal RS, Agarwal S, Sohal BH (1995a) Oxidative stress and aging in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Mech Ageing Dev* 81:15-25.
- Sohal RS, Agarwal A, Agarwal S, Orr WC (1995b) Simultaneous overexpression of copper- and zinc-containing superoxide dismutase and catalase retards age-related oxidative damage and increases metabolic potential in *Drosophila melanogaster*. *J Biol Chem* 270:15671-15674.
- Sohal RS, Mockett RJ, Orr WC (2002) Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. *Free Radic Biol Med* 33:575-586.
- Sotelo C (1967) Cerebellar neuroglia: morphological and histochemical aspects. *Prog Brain Res* 25:226-250.
- Sotelo C (1978) Purkinje cell ontogeny: formation and maintenance of spines. *Prog Brain Res* 48:149-170.
- Sotelo C (1990) Cerebellar synaptogenesis: what we can learn from mutant mice. *J Exp Biol* 153:225-249.
- Sotelo C, Changeux JP (1974) Transsynaptic degeneration 'en cascade' in the cerebellar cortex of staggerer mutant mice. *Brain Res* 67:519-526.
- Sotelo C, Bourrat F, Triller A (1984) Postnatal development of the inferior olivary complex in the rat. II. Topographic organization of the immature olivocerebellar projection. *J Comp Neurol* 222:177-199.
- Stadtman ER (1995) Role of oxidized amino acids in protein breakdown and stability. *Methods Enzymol* 258:379-393.
- Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J (1992) Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* 258:1898-1902.
- Stapleton CM, Jaradat M, Dixon D, Kang HS, Kim SC, Liao G, Carey MA, Cristiano J, Moorman MP, Jetten AM (2005) Enhanced susceptibility of staggerer (RORalpha^{sg/sg}) mice to lipopolysaccharide-induced lung inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 289:L144-152.
- Stehlin-Gaon C, Willmann D, Zeyer D, Sanglier S, Van Dorsselaer A, Renaud JP, Moras D, Schule R (2003) All-trans retinoic acid is a ligand for the orphan nuclear receptor ROR beta. *Nat Struct Biol* 10:820-825.
- Steinhilber D, Brungs M, Werz O, Wiesenberg I, Danielsson C, Kahlen JP, Nayeri S, Schrader M, Carlberg C (1995) The nuclear receptor for melatonin represses 5-lipoxygenase gene expression in human B lymphocytes. *J Biol Chem* 270:7037-7040.

- Steinmayr M, Andre E, Conquet F, Rondi-Reig L, Delhaye-Bouchaud N, Auclair N, Daniel H, Crepel F, Mariani J, Sotelo C, Becker-Andre M (1998) staggerer phenotype in retinoid-related orphan receptor alpha-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:3960-3965.
- Sturrock RR (1989) Changes in neuron number in the cerebellar cortex of the ageing mouse. *J Hirnforsch* 30:499-503.
- Sugioka K, Nakano M, Totsune-Nakano H, Minakami H, Tero-Kubota S, Ikegami Y (1988) Mechanism of O₂- generation in reduction and oxidation cycle of ubiquinones in a model of mitochondrial electron transport systems. *Biochim Biophys Acta* 936:377-385.
- Sundvold H, Lien S (2001) Identification of a novel peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma promoter in man and transactivation by the nuclear receptor RORalpha1. *Biochem Biophys Res Commun* 287:383-390.

T

- Takeuchi Y, Kimura H, Sano Y (1982) Immunohistochemical demonstration of serotonin-containing nerve fibers in the cerebellum. *Cell Tissue Res* 226:1-12.
- Tan K, Le Douarin NM (1991) Development of the nuclei and cell migration in the medulla oblongata. Application of the quail-chick chimera system. *Anat Embryol (Berl)* 183:321-343.
- Tata JR (1993) Gene expression during metamorphosis: an ideal model for post-embryonic development. *Bioessays* 15:239-248.
- Tata JR (2000) Autoinduction of nuclear hormone receptors during metamorphosis and its significance. *Insect Biochem Mol Biol* 30:645-651.
- Tata JR (2005) Amphibian metamorphosis as a model for the developmental actions of thyroid hormone. *Mol Cell Endocrinol*.
- Tchou J, Kasai H, Shibutani S, Chung MH, Laval J, Grollman AP, Nishimura S (1991) 8-oxoguanine (8-hydroxyguanine) DNA glycosylase and its substrate specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:4690-4694.
- Thannickal VJ, Fanburg BL (2000) Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279:L1005-1028.
- Thomas KR, Musci TS, Neumann PE, Capecchi MR (1991) Swaying is a mutant allele of the proto-oncogene *Wnt-1*. *Cell* 67:969-976.
- Thompson CC (1996) Thyroid hormone-responsive genes in developing cerebellum include a novel synaptotagmin and a hairless homolog. *J Neurosci* 16:7832-7840.
- Thompson CC, Bottcher MC (1997) The product of a thyroid hormone-responsive gene interacts with thyroid hormone receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:8527-8532.
- Tinel A, Tschopp J (2004) The PIDDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress. *Science* 304:843-846.
- Tini M, Tsui LC, Giguere V (1994) Heterodimeric interaction of the retinoic acid and thyroid hormone receptors in transcriptional regulation on the gamma F-crystallin everted retinoic acid response element. *Mol Endocrinol* 8:1494-1506.
- Tini M, Fraser RA, Giguere V (1995) Functional interactions between retinoic acid receptor-related orphan nuclear receptor (ROR alpha) and the retinoic acid receptors in the regulation of the gamma F-crystallin promoter. *J Biol Chem* 270:20156-20161.
- Tolbert DL, Clark BR (2000) Olivocerebellar projections modify hereditary Purkinje cell degeneration. *Neuroscience* 101:417-433.
- Tolbert DL, Clark BR (2003) GDNF and IGF-I trophic factors delay hereditary Purkinje cell degeneration and the progression of gait ataxia. *Exp Neurol* 183:205-219.
- Tolbert DL, Bradley MW, Tolod EG, Torres-Aleman I, Clark BR (2001) Chronic intraventricular infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) rescues some cerebellar Purkinje cells from heredodegeneration. *Exp Neurol* 170:375-379.
- Trenkner E (1979) Postnatal cerebellar cells of staggerer mutant mice express immature components on their surface. *Nature* 277:566-567.

- Trenkner E, Hoffmann MK (1986) Defective development of the thymus and immunological abnormalities in the neurological mouse mutation "staggerer". *J Neurosci* 6:1733-1737.
- Triarhou LC, Ghetti B (1991) Stabilisation of neurone number in the inferior olivary complex of aged 'Purkinje cell degeneration' mutant mice. *Acta Neuropathol (Berl)* 81:597-602.
- Triarhou LC, Norton J, Ghetti B (1987) Anterograde transsynaptic degeneration in the deep cerebellar nuclei of Purkinje cell degeneration (pcd) mutant mice. *Exp Brain Res* 66:577-588.
- Troost D, van Rossum A, Straks W, Willemse J (1982) Menkes' kinky hair disease. II. A clinicopathological report of three cases. *Brain Dev* 4:115-126.
- Troy CM, Shelanski ML (2003) Caspase-2 redux. *Cell Death Differ* 10:101-107.
- Turrens JF, Alexandre A, Lehninger AL (1985) Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 237:408-414.

U

- Ueda H, Sun GC, Murata T, Hirose S (1992) A novel DNA-binding motif abuts the zinc finger domain of insect nuclear hormone receptor FTZ-F1 and mouse embryonal long terminal repeat-binding protein. *Mol Cell Biol* 12:5667-5672.
- Ueda HR, Hayashi S, Chen W, Sano M, Machida M, Shigeyoshi Y, Iino M, Hashimoto S (2005) System-level identification of transcriptional circuits underlying mammalian circadian clocks. *Nat Genet* 37:187-192.
- Ueda HR, Chen W, Adachi A, Wakamatsu H, Hayashi S, Takasugi T, Nagano M, Nakahama K, Suzuki Y, Sugano S, Iino M, Shigeyoshi Y, Hashimoto S (2002) A transcription factor response element for gene expression during circadian night. *Nature* 418:534-539.
- Uzman LL (1960) The histogenesis of the mouse cerebellum as studied by its tritiated thymidine uptake. *J Comp Neurol* 114:137-159.

V

- Vander Heiden MG, Thompson CB (1999) Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis? *Nat Cell Biol* 1:E209-216.
- Vanfleteren JR (1993) Oxidative stress and ageing in *Caenorhabditis elegans*. *Biochem J* 292 (Pt 2):605-608.
- Vassileva G, Smeyne RJ, Morgan JI (1997) Absence of neuroanatomical and behavioral deficits in L7/pcp-2-null mice. *Brain Res Mol Brain Res* 46:333-337.
- Vernet-der Garabedian B, Lemaigre-Dubreuil Y, Delhaye-Bouchaud N, Mariani J (1998) Abnormal IL-1beta cytokine expression in the cerebellum of the ataxic mutant mice staggerer and lurcher. *Brain Res Mol Brain Res* 62:224-227.
- Villey I, de Chasseval R, de Villartay JP (1999) RORgammaT, a thymus-specific isoform of the orphan nuclear receptor RORgamma / TOR, is up-regulated by signaling through the pre-T cell receptor and binds to the TEA promoter. *Eur J Immunol* 29:4072-4080.
- Vincent J, Legrand C, Rabie A, Legrand J (1982) Effects of thyroid hormone on synaptogenesis in the molecular layer of the developing rat cerebellum. *J Physiol (Paris)* 78:729-738.
- Vogel MW, Prittie J (1995) Purkinje cell dendritic arbors in chick embryos following chronic treatment with an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist. *J Neurobiol* 26:537-552.
- Vogel MW, Sinclair M, Qiu D, Fan H (2000) Purkinje cell fate in staggerer mutants: agenesis versus cell death. *J Neurobiol* 42:323-337.
- Vu-Dac N, Gervois P, Grotzinger T, De Vos P, Schoonjans K, Fruchart JC, Auwerx J, Mariani J, Tedgui A, Staels B (1997) Transcriptional regulation of apolipoprotein A-I gene expression by the nuclear receptor RORalpha. *J Biol Chem* 272:22401-22404.
- Vulpe C, Levinson B, Whitney S, Packman S, Gitschier J (1993) Isolation of a candidate gene for Menkes disease and evidence that it encodes a copper-transporting ATPase. *Nat Genet* 3:7-13.

W

- Wallace VA (1999) Purkinje-cell-derived Sonic hedgehog regulates granule neuron precursor cell proliferation in the developing mouse cerebellum. *Curr Biol* 9:445-448.
- Wang GL, Semenza GL (1993a) Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia. *J Biol Chem* 268:21513-21518.
- Wang GL, Semenza GL (1993b) General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:4304-4308.
- Wang VY, Zoghbi HY (2001) Genetic regulation of cerebellar development. *Nat Rev Neurosci* 2:484-491.
- Wassef M, Zanetta JP, Brehier A, Sotelo C (1985) Transient biochemical compartmentalization of Purkinje cells during early cerebellar development. *Dev Biol* 111:129-137.
- Wassef M, Simons J, Tappaz ML, Sotelo C (1986) Non-Purkinje cell GABAergic innervation of the deep cerebellar nuclei: a quantitative immunocytochemical study in C57BL and in Purkinje cell degeneration mutant mice. *Brain Res* 399:125-135.
- Watters DJ (2003) Oxidative stress in ataxia telangiectasia. *Redox Rep* 8:23-29.
- Wechsler-Reya R, Scott MP (2001) The developmental biology of brain tumors. *Annu Rev Neurosci* 24:385-428.
- Weeks JC (2003) Thinking globally, acting locally: steroid hormone regulation of the dendritic architecture, synaptic connectivity and death of an individual neuron. *Prog Neurobiol* 70:421-442.
- Weeks JC, Levine RB (1990) Postembryonic neuronal plasticity and its hormonal control during insect metamorphosis. *Annu Rev Neurosci* 13:183-194.
- Weinberger C, Hollenberg SM, Rosenfeld MG, Evans RM (1985) Domain structure of human glucocorticoid receptor and its relationship to the v-erb-A oncogene product. *Nature* 318:670-672.
- White KP, Rifkin SA, Hurban P, Hogness DS (1999) Microarray analysis of *Drosophila* development during metamorphosis. *Science* 286:2179-2184.
- Wiesenberg I, Missbach M, Kahlen JP, Schrader M, Carlberg C (1995) Transcriptional activation of the nuclear receptor RZR alpha by the pineal gland hormone melatonin and identification of CGP 52608 as a synthetic ligand. *Nucleic Acids Res* 23:327-333.
- Wiesenberg I, Chiesi M, Missbach M, Spanka C, Pignat W, Carlberg C (1998) Specific activation of the nuclear receptors PPARgamma and RORA by the antidiabetic thiazolidinedione BRL 49653 and the antiarthritic thiazolidinedione derivative CGP 52608. *Mol Pharmacol* 53:1131-1138.
- Williams RS, Marshall PC, Lott IT, Caviness VS, Jr. (1978) The cellular pathology of Menkes steely hair syndrome. *Neurology* 28:575-583.
- Wilson TE, Fahrner TJ, Milbrandt J (1993) The orphan receptors NGFI-B and steroidogenic factor 1 establish monomer binding as a third paradigm of nuclear receptor-DNA interaction. *Mol Cell Biol* 13:5794-5804.
- Wilson TE, Fahrner TJ, Johnston M, Milbrandt J (1991) Identification of the DNA binding site for NGFI-B by genetic selection in yeast. *Science* 252:1296-1300.
- Wilson TE, Paulsen RE, Padgett KA, Milbrandt J (1992) Participation of non-zinc finger residues in DNA binding by two nuclear orphan receptors. *Science* 256:107-110.
- Winrow CJ, Capone JP, Rachubinski RA (1998) Cross-talk between orphan nuclear hormone receptor RZRalpha and peroxisome proliferator-activated receptor alpha in regulation of the peroxisomal hydratase-dehydrogenase gene. *J Biol Chem* 273:31442-31448.
- Woodward DJ, Hoffer BJ, Siggins GR, Bloom FE (1971) The ontogenetic development of synaptic junctions, synaptic activation and responsiveness to neurotransmitter substances in rat cerebellar purkinje cells. *Brain Res* 34:73-97.
- Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR (1980) Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68:251-306.

Wyllie AH, Morris RG, Smith AL, Dunlop D (1984) Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J Pathol* 142:67-77.

Y

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

Yim MB, Kang JH, Yim HS, Kwak HS, Chock PB, Stadtman ER (1996) A gain-of-function of an amyotrophic lateral sclerosis-associated Cu,Zn-superoxide dismutase mutant: An enhancement of free radical formation due to a decrease in Km for hydrogen peroxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:5709-5714.

Yoshimura N (1994) Histochemical localization of copper in various organs of brindled mice. *Pathol Int* 44:14-19.

Yu BP (1994) Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 74:139-162.

Yue Z, Horton A, Bravin M, DeJager PL, Selimi F, Heintz N (2002) A novel protein complex linking the delta 2 glutamate receptor and autophagy: implications for neurodegeneration in lurcher mice. *Neuron* 35:921-933.

Z

Zanzami N, Kroemer G (2001) The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:67-71.

Zanjani HS, Mariani J, Herrup K (1990) Cell loss in the inferior olive of the staggerer mutant mouse is an indirect effect of the gene. *J Neurogenet* 6:229-241.

Zanjani HS, Mariani J, Delhay-Bouchaud N, Herrup K (1992) Neuronal cell loss in heterozygous staggerer mutant mice: a model for genetic contributions to the aging process. *Brain Res Dev Brain Res* 67:153-160.

Zanjani HS, Herrup K, Guastavino JM, Delhay-Bouchaud N, Mariani J (1994) Developmental studies of the inferior olivary nucleus in staggerer mutant mice. *Brain Res Dev Brain Res* 82:18-28.

Zanjani HS, Vogel MW, Delhay-Bouchaud N, Martinou JC, Mariani J (1996) Increased cerebellar Purkinje cell numbers in mice overexpressing a human bcl-2 transgene. *J Comp Neurol* 374:332-341.

Zanjani HS, Vogel MW, Delhay-Bouchaud N, Martinou JC, Mariani J (1997) Increased inferior olivary neuron and cerebellar granule cell numbers in transgenic mice overexpressing the human Bcl-2 gene. *J Neurobiol* 32:502-516.

Zhao Q, Khorasanizadeh S, Miyoshi Y, Lazar MA, Rastinejad F (1998) Structural elements of an orphan nuclear receptor-DNA complex. *Mol Cell* 1:849-861.

Zhivotovsky B (2003) Caspases: the enzymes of death. *Essays Biochem* 39:25-40.

Zou L, Hagen SG, Strait KA, Oppenheimer JH (1994) Identification of thyroid hormone response elements in rodent Pcp-2, a developmentally regulated gene of cerebellar Purkinje cells. *J Biol Chem* 269:13346-13352.

Zuo J, De Jager PL, Takahashi KA, Jiang W, Linden DJ, Heintz N (1997) Neurodegeneration in Lurcher mice caused by mutation in delta2 glutamate receptor gene. *Nature* 388:769-773.

ANNEXES

Liste des Publications

Boukhtouche F, Brugg B, Wehrlé R, Dusart I & Mariani J. Thyroid hormone (T3)-induced early PC differentiation involves ROR α .

Article en préparation.

Boukhtouche F, Doulazmi M, Frederic F, Dusart I, Brugg B & Jean Mariani (2006). ROR α , a pivotal nuclear receptor for Purkinje neuron survival and differentiation: from development to ageing.

The Cerebellum, sous presse.

Boukhtouche F, Vodjdani G, Jarvis CI, Bakouche J, Staels B, Mallet J, Mariani J, Lemaigre-Dubreuil Y & Brugg B (2006). hROR α 1 overexpression protects neurons against oxidative stress-induced apoptosis.

J Neurochem 96(6):1778-89.

Boukhtouche F, Janmaat S, Vodjdani G, Gautheron V, Mallet J, Dusart I & Mariani J (2006). Retinoid-Related Orphan Receptor {alpha} Controls the Early Steps of Purkinje Cell Dendritic Differentiation.

J Neurosci 26:1531-1538.

Carimalo J, Cronier S, Petit G, Peyrin JM, **Boukhtouche F**, Arbez N, Lemaigre-Dubreuil Y, Brugg B & Miquel MC (2005). Activation of the JNK-c-Jun pathway during the early phase of neuronal apoptosis induced by PrP106-126 and prion infection.

Eur J Neurosci 21:2311-2319.

Boukhtouche F, Mariani J & Tedgui A (2004). The "CholesteROR" protective pathway in the vascular system.

Arterioscler Thromb Vasc Biol 24:637-643.

Article IV: The "CholesteROR" protective pathway in the vascular system

Article IV: The "CholesteROR" protective pathway in the vascular system.

Fatiha Boukhtouche, Jean Mariani & Alain Tedgui.

Arterioscler Thromb Vasc Biol, 24(4): 637-643, 2004.

Abstract

Retinoic acid receptor-related Orphan Receptor α (ROR α) is a member of the nuclear hormone receptor superfamily. ROR α has long been considered as a constitutive activator of transcription in the absence of exogenous ligand; however, recently, cholesterol has been identified as the natural ligand of ROR α .

The spontaneous *staggerer* mutation is a deletion in the Rora gene that prevents the translation of the ligand binding domain (LBD), leading to the loss of the ROR α activity. The homozygous Rora^{sg/sg} mutant mouse, of which the most obvious phenotype is ataxia associated with cerebellar degeneration, also displays a variety of other phenotypes, including several vascular ones, in particular dysfunction of smooth muscle cells and enhanced susceptibility to atherosclerosis. Moreover, ROR α appears to participate in the regulation of plasma cholesterol levels. It has been shown to positively regulate apolipoprotein (Apo)-AI and Apo-CIII gene expression. Yet, its activity is regulated by cholesterol itself, making ROR α an intracellular cholesterol target.

Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology

JOURNAL OF THE AMERICAN HEART ASSOCIATION



The "CholesteROR" Protective Pathway in the Vascular System

Fatiha Boukhtouche, Jean Mariani and Alain Tedgui

Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2004;24;637-643; originally published online Jan 29, 2004;

DOI: 10.1161/01.ATV.0000119355.56036.de

Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology is published by the American Heart Association.
7272 Greenville Avenue, Dallas, TX 75214

Copyright © 2004 American Heart Association. All rights reserved. Print ISSN: 1079-5642. Online ISSN: 1524-4636

The online version of this article, along with updated information and services, is located on the World Wide Web at:

<http://atvb.ahajournals.org/cgi/content/full/24/4/637>

Subscriptions: Information about subscribing to Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology is online at
<http://atvb.ahajournals.org/subscriptions/>

Permissions: Permissions & Rights Desk, Lippincott Williams & Wilkins, 351 West Camden Street, Baltimore, MD 21202-2436. Phone 410-5280-4050. Fax: 410-528-8550. Email:
journalpermissions@lww.com

Reprints: Information about reprints can be found online at
<http://www.lww.com/static/html/reprints.html>

The “CholesteROR” Protective Pathway in the Vascular System

Fatiha Boukhtouche, Jean Mariani, Alain Tedgui

Abstract—Retinoic acid receptor-related Orphan Receptor α (ROR α) is a member of the nuclear hormone receptor superfamily. ROR α has long been considered as a constitutive activator of transcription in the absence of exogenous ligand; however, cholesterol has recently been identified as a natural ligand of ROR α . The spontaneous *staggerer* (*sg/sg*) mutation is a deletion in the Rora gene that prevents the translation of the ligand-binding domain (LBD), leading to the loss of ROR α activity. The homozygous Rora^{sg/sg} mutant mouse, of which the most obvious phenotype is ataxia associated with cerebellar degeneration, also displays a variety of other phenotypes, including several vascular ones; in particular, dysfunction of smooth muscle cells and enhanced susceptibility to atherosclerosis. Moreover, ROR α appears to participate in the regulation of plasma cholesterol levels, and has been shown to positively regulate apolipoprotein (apo)A-I and apoC-III gene expression. Yet its activity is regulated by cholesterol itself, making ROR α an intracellular cholesterol target. (*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:637-643.)

Key Words: ROR α ■ cholesterol ■ statins ■ atherosclerosis ■ lipid homeostasis

Retinoic acid receptor-related Orphan Receptor α (ROR α), initially described as an orphan nuclear receptor, has recently been deorphanized by the identification of its natural ligand as cholesterol or a cholesterol derivative.^{1,2} ROR α has been shown to be implicated in the development and/or differentiation of many tissues, and provides protection against age-related degenerative processes, including atherosclerosis. In addition, ROR α activates the apolipoprotein A-I (apoA-I) and apoC-III gene transcription,^{3,4} modulates the vasomotor tone of small resistance arteries, and participates in the regulation of postischemic angiogenesis.^{5,6} This review focuses on the link between ROR α , vascular biology, and cholesterol homeostasis. Interestingly, recent findings suggest that ROR α is an intracellular cholesterol target.¹

Cellular Roles of Cholesterol

Cholesterol is the predominant sterol present in the plasma membrane. It is a key component of membrane structure with functional roles, including modulation of membrane fluidity. The distribution of cholesterol throughout the membrane is heterogeneous, being the main component of the majority of membrane lipid domains (lipid rafts) involved in a variety of cell functions, including growth-factor signal transduction, cellular adhesion, axon guidance, vesicular trafficking, and membrane-associated proteolysis.⁷⁻¹¹ Cholesterol depletion may have deleterious cellular effects, especially in neurons, which display vast cellular membranes. During axonal growth and synaptogenesis, neurons require the constant

supply of lipid molecules, including cholesterol, for the synthesis of new plasma membrane.^{12,13}

In vitro or in vivo cholesterol depletion can be achieved by treatment with statins, the competitive inhibitors of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase, a key enzyme in mevalonate metabolism. Statins prevent the conversion of HMG-CoA to mevalonic acid and the synthesis of bioactive sterol and nonsterol metabolic intermediates deriving from the cholesterol synthesis pathway.¹⁴ In vitro studies have shown that statins inhibit the growth and proliferation of various types of cells, indicating that cholesterol or nonsteroid isoprenoid products are required in the maintenance of cell functions. Using squalenstatin, an inhibitor of squalene synthase that selectively inhibits cholesterol biosynthesis without interfering with other critical reactions involving the generation of nonsterol metabolites,¹⁵ it has been shown that the viability of neurons,¹⁶ as well as the synaptic plasticity,¹⁷ depend on the intracellular cholesterol content.

On the other hand, cholesterol is the precursor of many steroids, and inborn errors of cholesterol synthesis are associated with malformation syndromes,^{18,19} such as Smith-Lemli-Optiz Syndrome (SLOS) or holoprosencephaly. Cholesterol is required during the posttranslational modification of Sonic hedgehog (Shh): cholesterol must be covalently attached to the N-terminal component of the protein²⁰ to allow its auto-cleavage and its morphogenic function.²¹ Thus, absence of cholesterol impairs Shh signaling during embryogenesis. The hedgehog signaling pathway is fundamental in

Received November 24, 2003; revision accepted January 15, 2004.

From the Laboratoire Développement et Vieillesse du Système Nerveux (F.B., J.M.), Université P. & M. Curie-CNRS, UMR NPA 7102, case 14, 9 quai Saint Bernard, 75005 Paris, France; and U541 INSERM, Hôpital Lariboisière (A.T.), 41 boulevard de la Chapelle, 75475 Paris, France

Correspondence to Alain Tedgui, INSERM U541, 41 boulevard de la Chapelle, 75475 Paris cedex 10, France. E-mail Alain.Tedgui@larib.inserm.fr
© 2004 American Heart Association, Inc.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. is available at <http://www.atvbaha.org>

DOI: 10.1161/01.ATV.0000119355.56036.de

early embryonic patterning, and Shh mutations are associated with holoprosencephaly in humans.²²

The cellular concentration of cholesterol is regulated by the control of its biosynthesis (de novo synthesis from acetyl CoA) and uptake of circulating low density lipoproteins (LDL) cholesterol. Reverse cholesterol transport (from peripheral cells to the liver) also occurs through high density lipoproteins (HDL). An abnormal cholesterol metabolism may have detrimental consequences, especially during ageing when the membrane fluidity decreases.²³

In vivo, altered cholesterol metabolism or transport is associated with cardiovascular and neurodegenerative diseases, including atherosclerosis and Alzheimer's disease (AD).

AD has been directly linked with cholesterol transport. Apolipoprotein (apo)E is a major apolipoprotein in the nervous system with a key role in cholesterol transport, implicated in the removal of remnant lipoproteins by the liver and in cholesterol efflux from peripheral cells. ApoE is a major risk factor for AD since $\epsilon 4$ allele dose (apoE4) has been genetically associated with the occurrence of the disease in patients with sporadic²⁴ and late-onset familial AD.^{25–27} Atherosclerosis is the most common vascular disease in which intimal accumulation of cholesterol and lipids constitutes a key event in atherosclerotic plaque formation.²⁸

Cholesterol is essential for cellular viability, and homeostasis of intracellular cholesterol is crucial to various cell functions. In addition to its role in cell membrane structure and function, cholesterol may regulate gene expression through its binding to a ligand-dependant nuclear receptor; recent studies have shown that cholesterol is a ligand of ROR α , which permits its transcriptional activity.^{1,2} This is the first assertion that native cholesterol can activate a transcription factor. Cholesterol derivatives (including steroid hormones and vitamin D) and oxidized cholesterol derivatives (oxysterols) are known to be signaling molecules,^{29–31} but this is the first time that native cholesterol has been proposed to activate a transcription factor.

Cholesterol Has Been Identified as the Natural Ligand of ROR α

ROR α , also called NR1F1,³² is a member of the superfamily of the nuclear receptors^{33,34} that includes receptors for thyroid and steroid hormones, retinoids, and vitamin D, as well as several "orphan" receptors of unknown ligands. Ligands for two of these receptors (peroxisome proliferator-activated receptors [PPARs] and liver X receptor [LXR])^{31,35} show that products of lipid metabolism such as fatty acids,^{36,37} prostaglandins,^{38,39} or oxidized cholesterol derivatives³⁰ can regulate gene expression by binding to nuclear receptors.

So far, three ROR isotypes ($-\alpha$, $-\beta$, $-\gamma$) have been described.^{40–43} No ligand has been identified for ROR γ yet, whereas all-*trans* retinoic acid has recently been described as a ligand of ROR β .⁴⁴

ROR α was initially described as an orphan receptor and has long been considered a constitutive activator of transcription in the absence of exogenous ligand. Kallen et al¹ have recently succeeded in crystallizing the ROR α ligand-binding domain (LBD) and revealed the presence of cholesterol in the

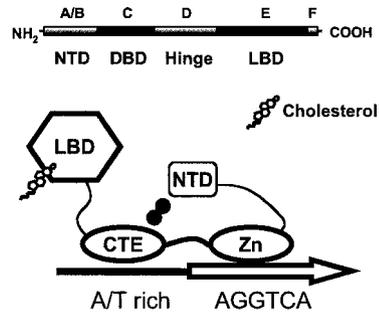


Figure 1. The ROR α protein. At the top is a schematic representation of a typical nuclear receptor. At the bottom is a depiction of the ROR α protein conformation with its interaction with its RORE promoter site. NTD indicates N-terminal domain; DBD, DNA-binding domain; LBD, ligand-binding domain.

ligand-binding pocket. Further experiments on purified ROR α LBD have shown the presence of a fortuitous ligand: cholesterol and 7-dehydrocholesterol (provitamin D₃) were shown to be the major ligands present in the LBD.²

ROR α LBD, expressed in *Spodoptera frugiperda* 9 (Sf-9) insect cells, was in a liganded form with bound cholesterol, which stabilizes the receptor in an agonistic conformation.¹ Depletion of cholesterol in U2OS osteosarcoma cells using the statin lovastatin in LDL-free serum dramatically decreases the transcriptional activity of ROR α , suggesting that changes in intracellular cholesterol level are capable of modulating the transcriptional activity of ROR α , which implies that cholesterol is a "real" ligand rather than just a structural cofactor.¹ Both ROR α and ROR β , two isotypes of the ROR receptor subfamily, thus appear to be ligand-regulated transcription factors, activated by different natural ligands.

ROR α , a Widely Expressed Nuclear Receptor Involved in Many Cellular Processes

ROR α is expressed in several tissues in which it activates the transcription of specific genes. ROR α , like all nuclear receptors, is composed of a variable N-terminal region (A/B region), a conserved DNA-binding domain (DBD) (C region), a linker, or hinge domain (D region), and a conserved E region that contains the LBD (Figure 1). The LBD contains an activation function motif (AF-2) responsible for ligand-dependant transcriptional activation (reviewed by Aranda et al⁴⁵).

ROR α interacts as a monomer with the ROR response element (RORE) sequence within the promoter regions of target genes composed of a 6-bp A/T-rich region immediately preceding a consensus AGGTCA motif.^{46–48} ROR α is also able to bind as a homodimer at direct repeats of the RORE site separated by two base pairs, or direct repeat (DR2) sites.^{49,50} An N-terminal modulator region varies between the four ROR α splice isoforms (termed ROR $\alpha 1$, $-\alpha 2$, $-\alpha 3$, and ROR $\alpha 4$, also called RZR α), allowing distinct interactions with AT-rich sequences just upstream of the AGGTCA motif, and distinct promoter recognition and transactivation properties through an identical DBD.⁴⁶

ROR α is a widely expressed nuclear receptor. In situ hybridization has revealed ROR α expression in the adult

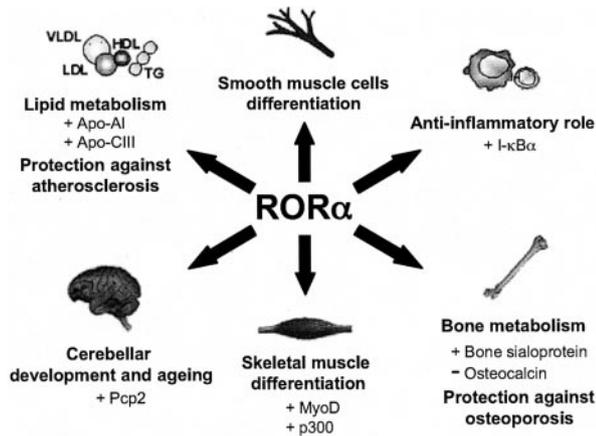


Figure 2. Physiological roles of ROR α . The schema describes the main target tissue of the ROR α action with known associated protein implicated. “+” indicates a positive regulation of the protein indicated, whereas “-” indicates a decrease.

brain in cerebellar Purkinje cells, inferior olive, olfactory bulb, hippocampus, thalamus, cortex, suprachiasmatic nuclei of the hypothalamus, and retinal ganglion cells.^{51,52} Outside the central nervous system, ROR α mRNA have been detected in thymus, skeletal muscle, skin, heart, vessels, liver, lung, gut, kidney tubules, whisker follicles, and pancreas.^{40,51,53,54}

ROR α Loss-of-Function Mutant Mice

ROR α functions have been studied with the help of the *staggerer* (*sg/sg*) mutant mouse. *sg/sg* is a spontaneous mutation consisting in a 122-bp deletion in the *Rora* gene that shifts the reading frame and prevents the translation of the LBD of the protein.⁵³ A ROR α deficient mouse (*Rora*^{-/-}) has been created by using a targeting vector in which a β -Gal gene replaces the second zinc finger of the DBD of ROR α .⁵¹ The *Rora*^{-/-} mouse displays a similar apparent cerebellar ataxic phenotype and massive cerebellar atrophy as the *Rora*^{sg/sg} mutant mouse, suggesting that the *sg/sg* mutation represents a loss of function of the ROR α protein.

Cellular Roles of ROR α

ROR α plays a major role in cellular differentiation during development and growth of numerous tissues. In addition to the cerebellar phenotype, further studies of the *sg/sg* mutant mouse have shown a variety of age-related phenotypes beyond the cerebellum, including muscular atrophy, immunodeficiencies, osteoporosis, and atherosclerosis (reviewed by Jarvis et al⁵⁵) (Figure 2). Moreover, in the vascular system, ROR α has been shown to be implicated in postischemic angiogenesis and in contractile functions of smooth muscle cells (SMC). We will briefly summarize these different abnormalities, and the vascular phenotype of the *sg/sg* mutant mouse will be described.

Cerebellar Degeneration

In the cerebellum, the loss of function of the ROR α protein causes a cell-autonomous developmental defect of the Purkinje cell,⁵⁶ leading to the absence of about 80% of the Purkinje cells at 2 months of age.⁵⁷ Purkinje cells seem to be generated in a normal number at the embryonic stage, but

undergo cell death most likely between postnatal ages of 0 and 5 days.⁵⁸

The *sg/sg* mutation was initially described as recessive, but a semi-dominant effect of the mutation has been highlighted. Despite a lack of overt clinical phenotype in heterozygous *sg/sg* mice (*Rora*^{sg/+}), Purkinje cell loss and a progressive atrophy of the dendrites of the surviving cells have been demonstrated in the cerebellum,^{59–61} and clear abnormalities in motor behavior have been revealed by using the rotarod test.⁶² The molecular mechanisms underlying the cerebellar *sg/sg* phenotype are still not understood, but both homozygous and heterozygous cerebellar phenotypes suggest that ROR α plays a neuroprotective role during development and ageing.

Osteoporosis

Susceptibility to osteoporosis has been revealed in *sg/sg* mutant, and ROR α has been implicated in bone formation and maintenance. Bones of *Rora*^{sg/sg} mice are thin, long, and osteopenic compared with the wild-type C57BL/6 mouse. ROR α expression in mesenchymal stem cells derived from bone marrow is increased during the osteogenic differentiation. A direct control by ROR α on mouse bone sialoglycoprotein and osteocalcin gene promoter has been characterized and may account in part for the mechanism of action of ROR α in bone.⁶³

Skeletal Muscle

ROR α is expressed in skeletal muscle and in proliferating myoblasts during their differentiation to postmitotic multinucleated myotubes, at least in vitro. ROR α has a positive influence on muscular development via the upregulation of MyoD and p300 expression.⁶⁴ MyoD activates muscle-specific gene transcription and promotes cell-cycle exit after the induction of differentiation.^{65–67} This study provides evidence that ROR α functions to positively regulate myogenesis (ie, muscle differentiation).

Roles of ROR α in the Vascular System

ROR α has been shown to be involved in the differentiation of SMC, in the control of the vascular tone of small arteries, in ischemia-induced angiogenesis, in lipid metabolism, and in inflammation.

In the vascular system, ROR α mRNA have been detected in human SMC, endothelial cells (EC), as well as in mammary arteries.^{54,68} ROR α expression is significantly decreased in human atherosclerotic plaques, whereas increased expression is observed after treatment with interleukin (IL)-1 β , tumour necrosis factor α (TNF α), and lipopolysaccharide (LPS) in both EC and human aortic SMC.⁵⁴

ROR α Function and SMC Differentiation

ROR α appears to be involved in the differentiation of SMC of small arteries.⁵ In *Rora*^{sg/sg} mutant mice, the expression of the SMC differentiation markers, calponin and h-caldesmon, are significantly decreased in mesenteric arteries. Moreover, ROR α is involved in the regulation of vascular tone of small resistance arteries. Mesenteric resistance arteries of *Rora*^{sg/sg} mice display lower mean blood pressure, as well as reduced flow-induced dilation and pressure-induced myogenic tone.

The vascular reactivity of mesenteric resistance arteries in response to vasoconstrictors and to endothelium-dependent or -independent vasodilators is also impaired. Furthermore, SMC from *Rora*^{sg/sg} mice display a reduced expression of the contractile protein SM-myosin, which might account for the observed decrease in contractile function in *Rora*^{sg/sg} mice. Thus, *RORα* seems to be essential in the differentiation and contractile function of SMC.

RORα and Ischemia-Induced Angiogenesis

The role of *RORα* in angiogenesis has been assessed by studying *Rora*^{sg/sg} mice with induced hindlimb ischemia.⁶ Femoral artery ligation induces a rapid and transient increase in *RORα* mRNA in ischemic tissue. In *Rora*^{sg/sg} mice, angiogenesis is markedly enhanced after ischemia induced by ligation of the femoral artery: capillary density is increased in the ischemic hindlimb, and leg perfusion is improved. Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) protein expression is increased in *Rora*^{sg/sg} mice, whereas the levels of antiangiogenic cytokine IL-12 are significantly reduced. These results demonstrate that *RORα* is a potent negative regulator of ischemia-induced angiogenesis.

RORα, Lipid Metabolism, and Atherosclerosis

Interestingly, the *sg/sg* mutation has been linked with several aspects of atherosclerosis, including impairment of lipid metabolism. *RORα* has been shown to bind to a RORE in the promoter of the murine apoA-I and apoC-III genes, and to directly regulate gene transcription,^{3,4} suggesting that *RORα* is a regulator of triglyceride and lipoprotein metabolism. ApoA-I is the major constituent of HDL, and apoC-III is a component of both triglyceride-rich lipoproteins and HDL. *Rora*^{sg/sg} mutants show significantly reduced plasma triglyceride levels associated with a strong decrease in apoC-III plasma concentrations,⁴ suggesting a physiological role of *RORα* in the regulation of plasma triglyceride metabolism in the mouse. This finding is likely to also apply to humans, since human *RORα1* overexpression in HepG2 cells activates human apoC-III promoter activity in cotransfection assays.⁴ Although elevated triglycerides likely affect atherosclerosis in humans, the effect of hypertriglyceridemia in mice is modest.⁶⁹ This might explain why, despite their decreased hepatic apoC-III gene expression,⁷⁰ *Rora*^{sg/sg} mice fed an atherogenic diet develop more severe atherosclerosis than wild type mice. In fact, *Rora*^{sg/sg} mice show a decrease in HDL levels related to a specific reduction of apoA-I gene expression in the intestine and decreased plasma apoA-I levels, compared with wild type controls.⁷⁰ The increased susceptibility to atherosclerosis was highly correlated with the hypoalphalipoproteinemia. Interestingly, the susceptibility to atherosclerosis observed in *Rora*^{sg/sg} fed an atherogenic diet resembles the exacerbated atherosclerosis development in female apoA-I-deficient mice crossed with human apoB transgenic mice and fed a high fat diet to increase total and LDL cholesterol.⁷¹

Inflammation has been shown to play a major role in atherogenesis,⁷² particularly through nuclear factor κ B (NF- κ B) activation.⁷³ Interestingly, *RORα* exerts antiinflammatory activities through inhibition of the NF- κ B signaling pathway (this aspect is described under "Inflammation"). It is

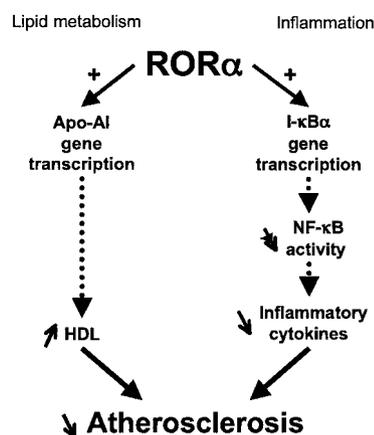


Figure 3. Mechanism of protection against atherosclerosis by *RORα*. The schema shows the action of *RORα* on lipid metabolism by the activation of the apoA-I gene transcription leading to the increase of HDL, in conjunction with its action on inflammation by the activation of the I- κ B α gene transcription, leading to the decrease of the NF- κ B activity and the decrease of production of inflammatory cytokines.

therefore likely that the enhanced atherosclerotic susceptibility of *Rora*^{sg/sg} mice is related both to low HDL plasma levels and to exaggerated inflammatory response to the high-fat, high-cholesterol diet.

Inflammation

Inflammation is a key element in both atherosclerosis⁷² and angiogenesis.⁷⁴ Interestingly, abnormalities in immune-inflammatory responses have been described in *Rora*^{sg/sg} mice. Homozygous *sg/sg* mutants have a delayed thymic development and a defect in terminating T-cell responses.⁷⁵ Moreover, peripheral macrophages of *sg/sg* mutants produce an abnormally high amount of proinflammatory cytokines IL-1, IL-6, and TNF α on LPS stimulation,⁷⁶ demonstrating a general condition of macrophage hyperexcitability. Interestingly, abnormal IL-1 β cytokine production has been also described in the brain after peripheral LPS treatment.⁷⁷

RORα has been reported to inhibit inflammatory responses in vascular SMC by transcriptional regulation of I- κ B α gene, the inhibitor of NF- κ B transcription factor activity. *RORα* negatively regulates the TNF α -induced inflammatory response in SMC. Ectopic expression of *RORα1* with an adenoviral vector in human primary SMC leads to a decreased expression in IL-6, IL-8, and cyclooxygenase-2 (COX-2) in response to TNF α .⁶⁸ Antiinflammatory activities of *RORα* result from the inhibition of NF- κ B signaling pathway by inducing I- κ B α gene expression. Furthermore, mRNA levels of I- κ B α are significantly reduced in aortas from *Rora*^{sg/sg} mice compared with controls, indicating an *in vivo* control of I- κ B α transcription by *RORα*. Antiinflammatory effects of *RORα* may contribute to the prevention of chronic inflammatory diseases in conjunction with regulation of specific target genes such as apoA-I in atherosclerosis (Figure 3).

Conclusion

RORα activates apoA-I transcription gene. ApoA-I, with HDL, carries cholesterol from peripheral cells to the liver,

preventing its accumulation in arterial walls. ROR α seems to be a key regulator of plasma cholesterol level. It also seems to be involved in triglyceride metabolism, because apoC-III gene expression is positively regulated by ROR α .⁴ ROR α , whose transcriptional activity is activated by cholesterol itself, is thus able to increase apoA-I expression, which leads to the decrease of intracellular cholesterol content, suggesting a negative feedback regulation of the intracellular cholesterol content by ROR α . This mechanism describes a new role for ROR α , which could act as an intracellular cholesterol level target.

ROR α exerts an antiatherogenic role both by inducing apoA-I expression and by regulating inflammation. In mammalian cells, the concentration of cholesterol is relatively high and might allow ROR α to be constitutively active. In vitro, ROR α activity can be decreased by lowering intracellular cholesterol drugs in absence of LDL cholesterol, and can be reactivated by adding cholesterol in depleted cells.¹ Thus, this study suggests that conditions that affect the cellular content of cholesterol, such as pharmacologic treatment or diseases that affect the synthesis or metabolism of cholesterol, could modulate the ROR α activity in vitro. Statins are widely used in treatment of coronary artery disease (CAD). Statins, which are inhibitors of the rate-limiting step of cellular cholesterol synthesis, are the most commonly used lipid-lowering drugs in the treatment of atherosclerosis. Statins are very effective in lowering cholesterol levels, mainly by reducing serum LDL cholesterol levels; by inhibiting intracellular cholesterol synthesis, statins enhance expression of LDL receptors at the cell surface and increase the uptake of cholesterol by cells, resulting in LDL clearance from the circulation⁷⁸ and intracellular cholesterol supply. Statins have also been shown to exert antiinflammatory actions.⁷⁹ Many of the pleiotropic effects of statins are mediated by their ability to block the synthesis of important isoprenoid intermediates, which serve as lipid attachments for a variety of intracellular signaling molecules.^{80–82} The potential inhibition of the antiatherogenic ROR α transcriptional activity by statins appears contradictory to the known beneficial effects of statins in the vascular system, through their antiinflammatory and antiatherogenic actions.⁷⁹

However, this apparent contradiction can be accounted for by the in vitro model used. The modulation of the ROR α transcriptional activity by statins has been assessed in in vitro studies with LDL serum-free medium.¹ However, total depletion in intracellular cholesterol has detrimental effects, leading to cell death. In vivo inhibition of cellular synthesis of cholesterol by statins results in increased uptake of circulating LDL cholesterol, leading to a compensation of decreased intracellular cholesterol synthesis. Therefore, it is most likely that in vivo statin treatment does not result in total depletion of cellular cholesterol, allowing ROR α to be active. Thereby, in vivo statin treatment is unlikely to impair the protective effects of ROR α in the vascular system.

ROR α is strongly implicated in the differentiation process of many cell types, and seems to have a protective role during ageing. Interestingly, ROR α -deficient mice Rora^{sg/sg} and Rora^{-/-} display a cerebellar neurodegeneration and age-related pathologies caused by a defect of survival and/or

differentiation of cells. If some effects of cholesterol on differentiation can be accounted for by the cellular need of this component in the vast plasma membrane, some effects of cholesterol could also be mediated by the activation of the nuclear receptor ROR α , allowing the expression of target genes implicated in the differentiation and cell survival.

References

1. Kallen JA, Schlaeppi JM, Bitsch F, Geisse S, Geiser M, Delhon I, Fournier B. X-Ray structure of the hRORalpha LBD at 1.63 Å: structural and functional data that cholesterol or a cholesterol derivative is the natural ligand of RORalpha. *Structure (Camb)*. 2002;10:1697–1707.
2. Bitsch F, Aichholz R, Kallen J, Geisse S, Fournier B, Schlaeppi JM. Identification of natural ligands of retinoic acid receptor-related orphan receptor alpha ligand-binding domain expressed in Sf9 cells—a mass spectrometry approach. *Anal Biochem*. 2003;323:139–149.
3. Vu-Dac N, Gervois P, Grotzinger T, De Vos P, Schoonjans K, Fruchart JC, Auwerx J, Mariani J, Tedgui A, Staels B. Transcriptional regulation of apolipoprotein A-I gene expression by the nuclear receptor RORalpha. *J Biol Chem*. 1997;272:22401–22404.
4. Raspe E, Duez H, Gervois P, Fievet C, Fruchart JC, Besnard S, Mariani J, Tedgui A, Staels B. Transcriptional regulation of apolipoprotein C-III gene expression by the orphan nuclear receptor RORalpha. *J Biol Chem*. 2001;276:2865–2871.
5. Besnard S, Bakouche J, Lemaigre-Dubreuil Y, Mariani J, Tedgui A, Henrion D. Smooth muscle dysfunction in resistance arteries of the sg/sg mouse, a mutant of the nuclear receptor RORalpha. *Circ Res*. 2002;90:820–825.
6. Besnard S, Silvestre JS, Duriez M, Bakouche J, Lemaigre-Dubreuil Y, Mariani J, Levy BI, Tedgui A. Increased ischemia-induced angiogenesis in the sg/sg mouse, a mutant of the nuclear receptor RORalpha. *Circ Res*. 2001;89:1209–1215.
7. Simons K, Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2000;1:31–39.
8. Brown DA, London E. Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1998;14:111–136.
9. Anderson RG. The caveolae membrane system. *Annu Rev Biochem*. 1998;67:199–225.
10. Tooze SA, Martens GJ, Huttner WB. Secretory granule biogenesis: rafting to the SNARE. *Trends Cell Biol*. 2001;11:116–122.
11. Wolozin B. A fluid connection: cholesterol and Abeta. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:5371–5373.
12. Pfrieger FW. Cholesterol homeostasis and function in neurons of the central nervous system. *Cell Mol Life Sci*. 2003;60:1158–1171.
13. Pfrieger FW. Role of cholesterol in synapse formation and function. *Biochim Biophys Acta*. 2003;1610:271–280.
14. Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*. 1990;343:425–430.
15. Crick DC, Suders J, Kluthe CM, Andres DA, Waechter CJ. Selective inhibition of cholesterol biosynthesis in brain cells by squalenstatin 1. *J Neurochem*. 1995;65:1365–1373.
16. Michikawa M, Yanagisawa K. Inhibition of cholesterol production but not of nonsterol isoprenoid products induces neuronal cell death. *J Neurochem*. 1999;72:2278–2285.
17. Koudinov AR, Koudinova NV. Essential role for cholesterol in synaptic plasticity and neuronal degeneration. *FASEB J*. 2001;15:1858–1860.
18. Porter FD. Malformation syndromes due to inborn errors of cholesterol synthesis. *J Clin Invest*. 2002;110:715–724.
19. Nwokoro NA, Wassif CA, Porter FD. Genetic disorders of cholesterol biosynthesis in mice and humans. *Mol Genet Metab*. 2001;74:105–119.
20. Porter JA, Young KE, Beachy PA. Cholesterol modification of hedgehog signaling proteins in animal development. *Science*. 1996;274:255–259.
21. Lewis PM, Dunn MP, McMahon JA, Logan M, Martin JF, St-Jacques B, McMahon AP. Cholesterol modification of sonic hedgehog is required for long-range signaling activity and effective modulation of signaling by Ptc1. *Cell*. 2001;105:599–612.
22. Roessler E, Belloni E, Gaudenzi K, Vargas F, Scherer SW, Tsui LC, Muenke M. Mutations in the C-terminal domain of Sonic Hedgehog cause holoprosencephaly. *Hum Mol Genet*. 1997;6:1847–1853.
23. Mattson MP, Duan W, Lee J, Guo Z. Suppression of brain aging and neurodegenerative disorders by dietary restriction and environmental enrichment: molecular mechanisms. *Mech Ageing Dev*. 2001;122:757–778.

24. Saunders AM, Schmader K, Breitner JC, Benson MD, Brown WT, Goldfarb L, Goldgaber D, Manwaring MG, Szymanski MH, McCown N. Apolipoprotein E epsilon 4 allele distributions in late-onset Alzheimer's disease and in other amyloid-forming diseases. *Lancet*. 1993;342:710-711.
25. Strittmatter WJ, Weisgraber KH, Huang DY, Dong LM, Salvesen GS, Pericak-Vance M, Schmechel D, Saunders AM, Goldgaber D, Roses AD. Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid beta peptide: isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90:8098-8102.
26. Strittmatter WJ, Saunders AM, Goedert M, Weisgraber KH, Dong LM, Jakes R, Huang DY, Pericak-Vance M, Schmechel D, Roses AD. Isoform-specific interactions of apolipoprotein E with microtubule-associated protein tau: implications for Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:11183-11186.
27. Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*. 1993;261:921-923.
28. Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis. the road ahead. *Cell*. 2001;104:503-516.
29. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*. 1995;83:835-839.
30. Janowski BA, Willy PJ, Devi TR, Falck JR, Mangelsdorf DJ. An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR α . *Nature*. 1996;383:728-731.
31. Lehmann JM, Kliewer SA, Moore LB, Smith-Oliver TA, Oliver BB, Su JL, Sundseth SS, Winegar DA, Blanchard DE, Spencer TA, Willson TM. Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway. *J Biol Chem*. 1997;272:3137-3140.
32. Nuclear Receptors Nomenclature Committee. A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell*. 1999;97:161-163.
33. Giguere V. Orphan nuclear receptors: from gene to function. *Endocr Rev*. 1999;20:689-725.
34. Jetten AM, Kurebayashi S, Ueda E. The ROR nuclear orphan receptor subfamily: critical regulators of multiple biological processes. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 2001;69:205-247.
35. Schoonjans K, Martin G, Staels B, Auwerx J. Peroxisome proliferator-activated receptors, orphans with ligands and functions. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 1997;8:159-166.
36. Keller H, Dreyer C, Medin J, Mahfoudi A, Ozato K, Wahli W. Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90:2160-2164.
37. Gustafsson JA, Gearing K, Widmark E, Tollet P, Stromstedt M, Berge RK, Gottlicher M. Effects of fatty acids on gene expression mediated by a member of the nuclear receptor supergene family. *Prog Clin Biol Res*. 1994;387:21-28.
38. Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelman BM, Evans RM. 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR γ . *Cell*. 1995;83:803-812.
39. Kliewer SA, Lenhard JM, Willson TM, Patel I, Morris DC, Lehmann JM. A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell*. 1995;83:813-819.
40. Becker-Andre M, Andre E, DeLamarter JF. Identification of nuclear receptor mRNAs by RT-PCR amplification of conserved zinc-finger motif sequences. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993;194:1371-1379.
41. Giguere V, Tini M, Flock G, Ong E, Evans RM, Otulakowski G. Isoform-specific amino-terminal domains dictate DNA-binding properties of ROR alpha, a novel family of orphan hormone nuclear receptors. *Genes Dev*. 1994;8:538-553.
42. Carlberg C, Hooft van Huijsduijnen R, Staple JK, DeLamarter JF, Becker-Andre M. RZR α , a new family of retinoid-related orphan receptors that function as both monomers and homodimers. *Mol Endocrinol*. 1994;8:757-770.
43. Hirose T, Smith RJ, Jetten AM. ROR gamma: the third member of ROR/RZR orphan receptor subfamily that is highly expressed in skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994;205:1976-1983.
44. Stehlin-Gaon C, Willmann D, Zeyer D, Sanglier S, Van Dorsselaer A, Renaud JP, Moras D, Schule R. All-trans retinoic acid is a ligand for the orphan nuclear receptor ROR beta. *Nat Struct Biol*. 2003;10:820-825.
45. Aranda A, Pascual A. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev*. 2001;81:1269-1304.
46. Giguere V, McBroom LD, Flock G. Determinants of target gene specificity for ROR alpha 1: monomeric DNA binding by an orphan nuclear receptor. *Mol Cell Biol*. 1995;15:2517-2526.
47. McBroom LD, Flock G, Giguere V. The nonconserved hinge region and distinct amino-terminal domains of the ROR alpha orphan nuclear receptor isoforms are required for proper DNA bending and ROR alpha-DNA interactions. *Mol Cell Biol*. 1995;15:796-808.
48. Zhao Q, Khorasanizadeh S, Miyoshi Y, Lazar MA, Rastinejad F. Structural elements of an orphan nuclear receptor-DNA complex. *Mol Cell*. 1998;1:849-861.
49. Harding HP, Atkins GB, Jaffe AB, Seo WJ, Lazar MA. Transcriptional activation and repression by RORalpha, an orphan nuclear receptor required for cerebellar development. *Mol Endocrinol*. 1997;11:1737-1746.
50. Moraitis AN, Giguere V. Transition from monomeric to homodimeric DNA binding by nuclear receptors: identification of RevErbAalpha determinants required for RORalpha homodimer complex formation. *Mol Endocrinol*. 1999;13:431-439.
51. Steinmayr M, Andre E, Conquet F, Rondi-Reig L, Delhaye-Bouchaud N, Auclair N, Daniel H, Crepel F, Mariani J, Sotelo C, Becker-Andre M. Staggerer phenotype in retinoid-related orphan receptor alpha-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:3960-3965.
52. Matsui T, Sashihara S, Oh Y, Waxman SG. An orphan nuclear receptor, mROR alpha, and its spatial expression in adult mouse brain. *Brain Res Mol Brain Res*. 1995;33:217-226.
53. Hamilton BA, Frankel WN, Kerrebrock AW, Hawkins TL, FitzHugh W, Kusumi K, Russell LB, Mueller KL, van Berkel V, Birren BW, Kruglyak L, Lander ES. Disruption of the nuclear hormone receptor RORalpha in staggerer mice. *Nature*. 1996;379:736-739.
54. Besnard S, Heymes C, Merval R, Rodriguez M, Galizzi JP, Boutin JA, Mariani J, Tedgui A. Expression and regulation of the nuclear receptor RORalpha in human vascular cells. *FEBS Lett*. 2002;511:36-40.
55. Jarvis CI, Staels B, Brugg B, Lemaigre-Dubreuil Y, Tedgui A, Mariani J. Age-related phenotypes in the staggerer mouse expand the RORalpha nuclear receptor's role beyond the cerebellum. *Mol Cell Endocrinol*. 2002;186:1-5.
56. Herrup K. Role of staggerer gene in determining cell number in cerebellar cortex. I. Granule cell death is an indirect consequence of staggerer gene action. *Brain Res*. 1983;313:267-274.
57. Doulazmi M, Frederic F, Capone F, Becker-Andre M, Delhaye-Bouchaud N, Mariani J. A comparative study of Purkinje cells in two RORalpha gene mutant mice: staggerer and RORalpha(-/-). *Brain Res Dev Brain Res*. 2001;127:165-174.
58. Vogel MW, Sinclair M, Qiu D, Fan H. Purkinje cell fate in staggerer mutants: agenesis versus cell death. *J Neurobiol*. 2000;42:323-337.
59. Zanjani HS, Mariani J, Delhaye-Bouchaud N, Herrup K. Neuronal cell loss in heterozygous staggerer mutant mice: a model for genetic contributions to the aging process. *Brain Res Dev Brain Res*. 1992;67:153-160.
60. Hadj-Sahraoui N, Frederic F, Zanjani H, Herrup K, Delhaye-Bouchaud N, Mariani J. Purkinje cell loss in heterozygous staggerer mutant mice during aging. *Brain Res Dev Brain Res*. 1997;98:1-8.
61. Hadj-Sahraoui N, Frederic F, Zanjani H, Delhaye-Bouchaud N, Herrup K, Mariani J. Progressive atrophy of cerebellar Purkinje cell dendrites during aging of the heterozygous staggerer mouse (Rora(+sg)). *Brain Res Dev Brain Res*. 2001;126:201-209.
62. Caston J, Delhaye-Bouchaud N, Mariani J. Motor behavior of heterozygous staggerer mutant (+sg) versus normal (+/+) mice during aging. *Behav Brain Res*. 1995;72:97-102.
63. Meyer T, Kneissel M, Mariani J, Fournier B. In vitro and in vivo evidence for orphan nuclear receptor RORalpha function in bone metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:9197-9202.
64. Lau P, Bailey P, Dowhan DH, Muscat GE. Exogenous expression of a dominant negative RORalpha1 vector in muscle cells impairs differentiation: RORalpha1 directly interacts with p300 and myoD. *Nucleic Acids Res*. 1999;27:411-420.
65. Tapscott SJ, Weintraub H. MyoD and the regulation of myogenesis by helix-loop-helix proteins. *J Clin Invest*. 1991;87:1133-1138.
66. Weintraub H, Dwarki VJ, Verma I, Davis R, Hollenberg S, Snider L, Lassar A, Tapscott SJ. Muscle-specific transcriptional activation by MyoD. *Genes Dev*. 1991;5:1377-1386.
67. Halevy O, Novitsch BG, Spicer DB, Skapek SX, Rhee J, Hannon GJ, Beach D, Lassar AB. Correlation of terminal cell cycle arrest of skeletal muscle with induction of p21 by MyoD. *Science*. 1995;267:1018-1021.
68. Delerive P, Monte D, Dubois G, Trottein F, Fruchart-Najib J, Mariani J, Fruchart JC, Staels B. The orphan nuclear receptor ROR alpha is a

- negative regulator of the inflammatory response. *EMBO Rep.* 2001;2:42–48.
69. Hayek T, Masucci-Magoulas L, Jiang X, Walsh A, Rubin E, Breslow JL, Tall AR. Decreased early atherosclerotic lesions in hypertriglyceridemic mice expressing cholesteryl ester transfer protein transgene. *J Clin Invest.* 1995;96:2071–2074.
70. Mamontova A, Seguret-Mace S, Esposito B, Chanial C, Bouly M, Delhay-Bouchaud N, Luc G, Staels B, Duverger N, Mariani J, Tedgui A. Severe atherosclerosis and hypoalphalipoproteinemia in the staggerer mouse, a mutant of the nuclear receptor ROR α . *Circulation.* 1998;98:2738–2743.
71. Voyiaki E, Goldberg IJ, Plump AS, Rubin EM, Breslow JL, Huang LS. ApoA-I deficiency causes both hypertriglyceridemia and increased atherosclerosis in human apoB transgenic mice. *J Lipid Res.* 1998;39:313–321.
72. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature.* 2002;420:868–874.
73. Kutuk O, Basaga H. Inflammation meets oxidation: NF- κ B as a mediator of initial lesion development in atherosclerosis. *Trends Mol Med.* 2003;9:549–557.
74. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med.* 2000;6:389–395.
75. Trenkner E, Hoffmann MK. Defective development of the thymus and immunological abnormalities in the neurological mouse mutation “staggerer”. *J Neurosci.* 1986;6:1733–1737.
76. Kopmels B, Mariani J, Delhay-Bouchaud N, Audibert F, Fradelizi D, Wollman EE. Evidence for a hyperexcitability state of staggerer mutant mice macrophages. *J Neurochem.* 1992;58:192–199.
77. Vernet-der Garabedian B, Lemaigre-Dubreuil Y, Delhay-Bouchaud N, Mariani J. Abnormal IL-1 β cytokine expression in the cerebellum of the ataxic mutant mice staggerer and lurcher. *Brain Res Mol Brain Res.* 1998;62:224–227.
78. Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science.* 1986;232:34–47.
79. Libby P, Aikawa M. Mechanisms of plaque stabilization with statins. *Am J Cardiol.* 2003;91:4B–8B.
80. Takemoto M, Liao JK. Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:1712–1719.
81. Blake GJ, Ridker PM. Are statins anti-inflammatory? *Curr Control Trials Cardiovasc Med.* 2000;1:161–165.
82. Weitz-Schmidt G. Statins as anti-inflammatory agents. *Trends Pharmacol Sci.* 2002;23:482–486.

Article V: ROR α , a pivotal nuclear receptor for Purkinje neuron survival and differentiation: from development to ageing

Article V: ROR α , a pivotal nuclear receptor for Purkinje neuron survival and differentiation: from development to ageing

Fatiha Boukhtouche, Mohamed Doulazmi, Florence Frederic, Isabelle Dusart, Bernard Brugg & Jean Mariani

The Cerebellum, in press, 2006.

Abstract

ROR α (Retinoid-related Orphan Receptor) is a transcription factor belonging to the superfamily of nuclear receptors. The spontaneous *staggerer* (*sg*) mutation, which consists of a deletion in the *Rora* gene, has been shown to cause the loss of function of the ROR α protein. The total loss of ROR α expression leads to cerebellar developmental defects, particularly to a dramatic decreased survival of Purkinje cells and an early block in the differentiation process. This review focuses on recent studies which position ROR α as a pivotal factor controlling Purkinje cell survival and differentiation, from development to ageing.

ORIGINAL ARTICLE

ROR α , a pivotal nuclear receptor for Purkinje neuron survival and differentiation: From development to ageing

FATIHA BOUKHTOUCHE¹, MOHAMED DOULAZMI¹, FLORENCE FREDERIC¹,
ISABELLE DUSART¹, BERNARD BRUGG¹ & JEAN MARIANI^{1,2}

¹Université Pierre et Marie Curie-Paris, Neurobiologie des Processus Adaptatifs (NPA) CNRS, Paris, and ²AP-HP, Hôpital Charles Foix, UEF, Ivry sur Seine, France

Abstract

ROR α (Retinoid-related Orphan Receptor) is a transcription factor belonging to the superfamily of nuclear receptors. The spontaneous *staggerer* (*sg*) mutation, which consists of a deletion in the *Rora* gene, has been shown to cause the loss of function of the ROR α protein. The total loss of ROR α expression leads to cerebellar developmental defects, particularly to a dramatic decreased survival of Purkinje cells and an early block in the differentiation process. This review focuses on recent studies which position ROR α as a pivotal factor controlling Purkinje cell survival and differentiation, from development to ageing.

Key words: ROR α , Purkinje cells, *staggerer* mutation

Introduction

Staggerer (*Rora*^{sg}) is a spontaneous null mutation consisting of a deletion in the gene encoding the nuclear receptor ROR α . Both ROR α -deficient mice – homozygous *staggerer* mutant mouse (*Rora*^{sg/sg}) and transgenic mice in which the *Rora* gene has been disrupted (*Rora*^{-/-}) – display a severe ataxic phenotype associated with a strong cerebellar hypoplasia, a consequence of the degeneration of a large majority of Purkinje cells during development and the consequent absence of virtually all granule cells (1,2). Interestingly, the few surviving Purkinje cells display immature shapes and abnormal differentiation. Moreover, both Purkinje cell survival and differentiation have been shown to be also abnormal in aged heterozygous *staggerer* mutants (*Rora*^{+/sg}), indicating a crucial role for ROR α in these processes from development to ageing. This review focuses on the recent findings which contribute to a better understanding of the role of ROR α in the cerebellar development, and particularly in the Purkinje cell survival and differentiation throughout development and ageing.

The nuclear receptor ROR α

ROR α (Retinoic acid receptor related Orphan Receptor α , also called NR1F1) (3) is a member of

the nuclear receptor superfamily, which includes receptors for thyroid and steroid hormones, retinoids and vitamin D (4,5). ROR α has long been considered as an orphan receptor, constitutively active in the absence of exogenous ligand (6,7). However, ROR α has since been shown to be activated by abundant intracellular cholesterol (8).

ROR α is composed of the characteristic nuclear receptor domains (Figure 1). ROR α has an amino-terminal domain (A/B region), a DNA binding domain (DBD or C region, conserved domain among the members of the nuclear receptors family), a hinge (D region) and a ligand binding domain (LBD or E region). The LBD contains a carboxy-terminus activation function domain (AF-2), responsible for ligand dependant transcriptional activation. The DBD, composed of two zinc finger motifs and a carboxy-terminal extension (CTE), is involved in the recognition of DNA response elements. The ROR response element (RORE) sequence is composed of a 6-base pair A/T-rich region immediately preceding a consensus AGGTCA motif (9–11). ROR α interacts as a monomer with RORE sequence within the promoter regions of target genes, but ROR α is also able to bind as a homodimer at direct repeats of the RORE site separated by two base pairs, or DR2 sites (12,13).

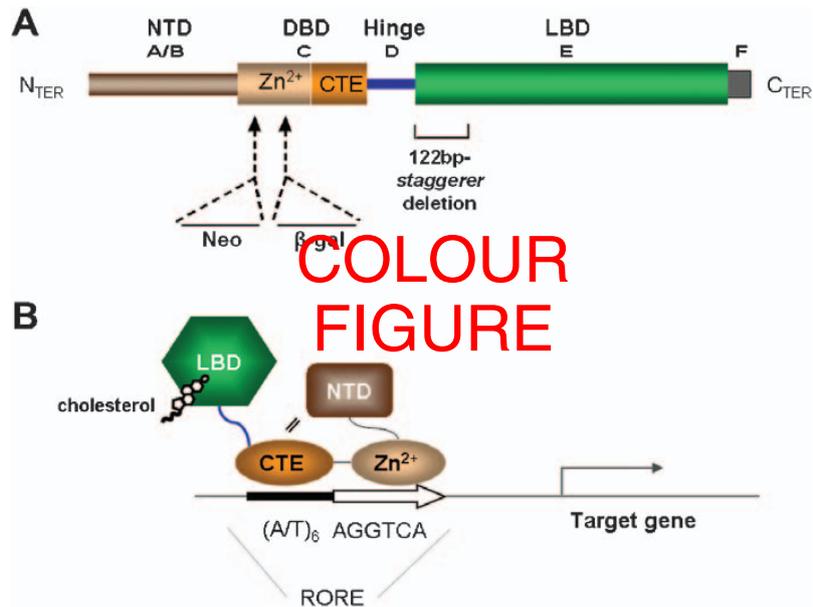


Figure 1. The ROR α protein. (A) Schematic representation of a typical nuclear receptor. Below are indicated the sites of insertion of the *LacZ* gene or the Neo cassette in the *Rora*^{-/-} mice and the site of the *staggerer* (*sg*) deletion. (B) Depiction of the ROR α protein conformation with its interaction with its RORE promoter site. NTD: N-Terminal Domain. DBD: DNA Binding Domain. LBD: Ligand Binding Domain.

By a combination of promoter usage and alternative splicing, the *Rora* gene gives rise to four isoforms in human, ROR α 1, α 2, α 3 and ROR α 4 (also termed RZR α), while only α 1 and α 4 isoforms have been detected in the mouse (14–16). These isoforms differ in their N-terminal modulator region, which interacts with A/T-rich sequences of the RORE and thus permits distinct promoter recognition and transactivation properties through an identical DNA binding domain (DBD) (9,14). Functionally active RORE have been identified in a number of putative target genes, but the functional regulation by ROR α *in vivo* remains to be demonstrated for many of them. Micro-array analyses of the cerebellar transcriptome in *staggerer* mutants followed by chromatin immunoprecipitation experiments identified authentic ROR α target genes in the cerebellum, including genes involved in calcium signal transduction (*Pcp2*, *Pcp4*, *Itp1*) and the mitogenic factor Sonic Hedgehog (*Shh*) (17).

ROR α expression

ROR α is a widely expressed nuclear receptor. ROR α has been detected in many tissues including brain, thymus, skeletal muscle, skin, heart, vessels, liver, lung, gut, kidney tubules, whisker follicles and pancreas (15,18–20). In the brain, *in situ* hybridization and immunohistochemical analyses revealed *Rora* expression in the cerebellum, in olfactory bulb, hippocampus, thalamus, cerebral cortex (mainly in layer IV), suprachiasmatic nuclei of the hypothalamus and retinal ganglion cells (18,21,22). In the cerebellum, ROR α mRNA and protein have been detected at high levels in Purkinje cells (from age

E13) and at lower level in stellate and basket interneurons (Figure 2) (22).

ROR α loss-of-function mutant mice

The homozygous *staggerer* mutant mouse displays a strong ataxic phenotype due to a massive cerebellar atrophy (Figure 2). The *staggerer* mutation has been identified as a 6.5-kb genomic deletion within the *Rora* gene, corresponding to a single 122-bp exon deletion in the mRNA, which removes the start of the LBD (see Figure 1A) and shifts the reading frame, causing a stop codon 27 residues later. The *staggerer* mutation thus prevents the translation of the LBD of the ROR α protein, involving the lack of any transcriptional activity (19,23).

Two strains of mice lacking a functional ROR α (*Rora*^{-/-} transgenic mice) have been generated, by using a targeting vector in which a *LacZ* gene replaces the second zinc finger of the DBD of ROR α (18) or by inserting a neomycin cassette in the first zinc finger of the DBD (24).

The strong decrease in *Rora*^{sg} allelic mRNA (19), together with the similar cerebellar phenotype displayed by both *Rora*^{sg/sg} and *Rora*^{-/-} mutants (18,24,25), suggests that the *staggerer* mutation is a null mutation and thus leads to the loss of function of ROR α .

Studying the *staggerer* phenotype has led to the discovery of many putative functions of ROR α . From the first identification of the developmental cerebellar defect in homozygous *staggerer* mutants in 1962 (1), the role of ROR α has since been expanded beyond the cerebellum, in particular in the control of circadian rhythms through the transcriptional

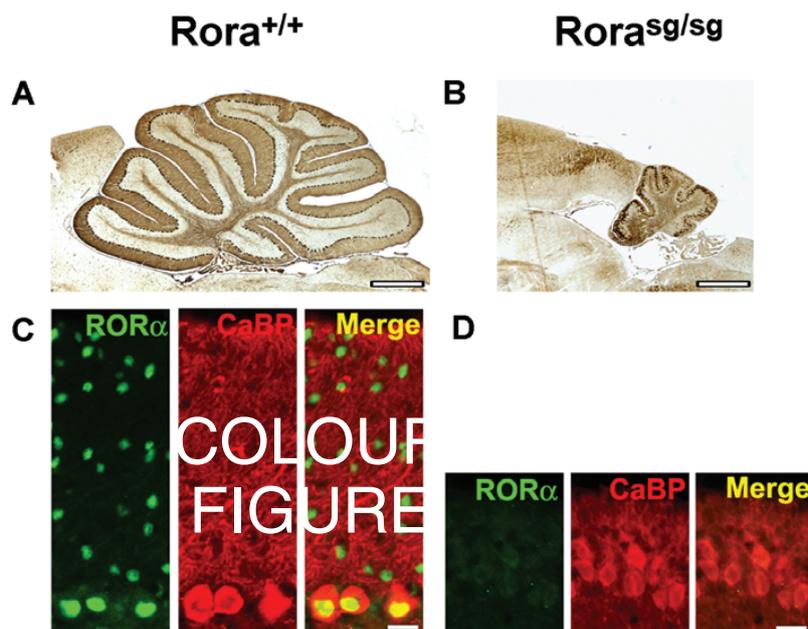


Figure 2. Cerebellar abnormalities in homozygous *staggerer* mutants. Parasagittal cerebellar sections taken from the vermis of *Rora*^{+/+} (A, C) and *Rora*^{sg/sg} (B, D) mice 2-months old. A–B: Calbindin (CaBP) immunostaining (brown) reveals the extreme hypoplasia of *Rora*^{sg/sg} cerebellum (B) compared to a control littermate (A). Scale bars correspond to 500 μ m. C–D: Immunohistochemistry of CaBP (red) and ROR α (green) reveal the expression of ROR α in both Purkinje cells and interneurons in *Rora*^{+/+} cerebellum (C), whereas no ROR α labelling is detected in the cerebellum of the *Rora*^{sg/sg} mutant mouse (D). In the *Rora*^{sg/sg} cerebellum, CaBP labelling reveals the disorganization of Purkinje cells (which are not organized in a monolayer) and the atrophic and rudimentary dendrites. The antibodies used were purchased from Swant (rabbit anti-CaBP) and from Santa-Cruz (goat anti-ROR α 1, sc-6062).

regulation of Bmal1 (26–30). Moreover, outside the central nervous system, ROR α has been shown to be implicated in the development of many tissues and in the differentiation process of many cell types, and provides protection against age-related degenerative processes including osteoporosis, atherosclerosis and chronic inflammation (for review, see 31,32).

Proliferative and neuroprotective function of ROR α in the cerebellum

Mutant mice lacking functional ROR α protein (18,19) display a massive cerebellar degeneration (1): most of the Purkinje cells degenerate (82% are lost at two months of age (25)) while granular cells are virtually all absent (33) in homozygous *staggerer* mutants. According to Vogel and collaborators, Purkinje cells die between the postnatal (P) day 0 and P5 (34). In the other parts of the brain, cell losses have been reported only in the olfactory bulb in the *staggerer* mutant mice (35).

To determine whether the effect of the *staggerer* mutation was direct (intrinsic) or indirect (extrinsic), *staggerer* \leftrightarrow wild-type chimeras were made by aggregating two embryos at the 8-cell stage of development. Analyses of these *staggerer* chimeras demonstrated that the Purkinje cell loss was a direct consequence of the cell-autonomous action of the *staggerer* mutation (36), which is consistent with the distribution of ROR α mRNA and protein in the

cerebellum, where only Purkinje cells and interneurons have been shown to express ROR α (19,22,37).

The granule cell loss has been shown to occur as a dual consequence of the PC loss. First, the study of the developmental persistence of the external granular layer (EGL) together with the study of the post-mitotic granule cell population in *staggerer* chimeras suggested that the reduced number of granule cells due to the *staggerer* mutation were the result of both reduced granule cell genesis and increased cell death (38). These hypotheses, based on the study of chimeras, have been confirmed recently by a molecular analysis of target genes of ROR α in the cerebellum (17). Microarray analyses of the developing *Rora*^{sg/sg} cerebellar transcriptome have shown a decreased expression of proliferation markers, while Shh has been identified as a ROR α target gene in the cerebellum (17). Quantification of BrdU incorporation revealed a decreased granular cell proliferation in *Rora*^{sg/sg} organotypic cultures compared to wild-type. Moreover, adding Shh in the mutant slice preparations could restore normal proliferation of granule cell precursors in *Rora*^{sg/sg} slices (17), confirming a crucial role of Shh in the granule cell proliferation (39). An indirect loss of almost 60% of the cells within the inferior olivary complex in *Rora*^{sg/sg} mutants has been also described (40–42).

The neurodegeneration in *Rora*^{sg/sg} mutants is accompanied by a chronic inflammatory state. Interestingly, stimulation of peripheral macrophages

of *Rora*^{sg/sg} mutants by lipopolysaccharide (LPS) induces an abnormally high amount of pro-inflammatory cytokines IL-1, IL-6 and TNF α (43). In addition, *Rora*^{sg/sg} mice are more susceptible to LPS-induced airway inflammation in the lung (44), and ROR α has been reported to inhibit inflammatory responses in vascular smooth muscle cells (45). The anti-inflammatory role of ROR α might be mediated in some tissues through the direct transcriptional control of the *I- κ B α* gene, an inhibitor of the NF- κ B transcription factor (45). Moreover, abnormal IL-1 β cytokine production has been also described in the *staggerer* brain after peripheral LPS treatment (46), demonstrating a general condition of hyperexcitability which could increase the neurodegeneration.

The mutation was initially described as recessive, since heterozygous *Rora*^{+/*sg*} mutants are behaviourally normal, without cell loss in the young adult. However, a Purkinje cell loss of about 25–35% appears afterwards and mostly between 6 and 12 months of age (47–49), whereas in control, Purkinje cell loss begins at 18 months to reach 25% at 24 months of age (49). The Purkinje cell loss in the *Rora*^{+/*sg*} mutant is accompanied by both granule cell (35%) and olivary neuron (30%) degeneration (47,50). Interestingly, although the level of *Rora*^{+/*sg*} Purkinje cell survival is similar between males and females at 13 months, the time-course of the loss depends on the sex in *Rora*^{+/*sg*} mutants. In males, the Purkinje cell loss starts from 1 month and continues regularly up to 13 months. In contrast, in females, Purkinje cell number remains stable up to 9 months of age, then decreases to the same number as males (49). These data indicate that *Rora*^{+/*sg*} heterozygous mutants undergo a more precocious Purkinje cell loss during ageing. Moreover, unlike controls, in which the later age-related Purkinje cell loss occurs similarly between males and females, the Purkinje cell loss time-course is influenced by the sex in *Rora*^{+/*sg*} animals. Half-dose loss of functional ROR α has thus revealed an influence of gender in Purkinje cell survival during ageing.

These results show that ROR α function is essential for Purkinje cell survival during development and ageing. Whereas half-dose of functional ROR α protein seems to be sufficient to allow Purkinje cell survival during development, *Rora*^{+/*sg*} mutant PCs are not protected against age-associated injuries. Among these, an increased vulnerability to oxidative stress is thought to play a critical role in age-related cell death (reviewed in (51–53)). The oxidative stress homeostasis is known to play a crucial role in the neuronal survival. The *Harlequin* (*Hq*) mutation, which disrupts the Apoptosis-Inducing Factor (AIF) gene, leads to an increased oxidative stress in brain (54). Interestingly, a progressive granular cell loss has been reported in the cerebellum of *Hq/Hq* mutants, suggesting a critical role of the anti-oxidant defenses in the neuronal survival during ageing.

To test whether an increased ROR α expression could be neuroprotective, we have recently developed a recombinant lentiviral vector to perform ROR α overexpression in cultured neurons. The survival rate of ROR α -overexpressing cortical neurons was evaluated in response to different stressors disturbing redox homeostasis, such as A β peptide, c₂-ceramide and H₂O₂ (55). In this study, we have shown that lentiviral-mediated hROR α 1-overexpression provides neuroprotection against reactive oxygen species (ROS)-induced apoptosis. Down-regulation of Gpx1 or Prx6 by si-RNA experiments partially suppressed the ROR α -mediated neuroprotection, further demonstrating that this protection is, at least in part, mediated by an up-regulation of the anti-oxidant enzymes glutathione peroxidase 1 and peroxiredoxin 6, which leads to a decrease of the oxidative stress in neurons. ROR α appears thus as a factor controlling the oxidative stress in neurons (55).

We can therefore propose a model in which the age-related increased Purkinje cell loss in *Rora*^{+/*sg*} animals could be linked to the loss of the anti-oxidant actions of ROR α , whereas in wild type animals the activity of ROR α might reduce the effects of oxidative stress, thus leading to a relative neuroprotection during ageing compared to that observed in the heterozygous *staggerer* mutant. Further studies will be needed to determine whether the observed Purkinje cell loss is linked to an increased ROS production in *Rora*^{+/*sg*} mutants.

Although the homozygous *staggerer* phenotype has been described for the first time in 1962 (1), the mechanism of Purkinje cell death in this mutant is still unknown. Interestingly, several studies have proposed the existence of a developmental Purkinje cell death period, occurring around P3 (56–60). An increased ROS production is thought to be involved in developmental cell death, such as in trophic factor starvation during development (61). In *Rora*^{sg/sg} mice, Purkinje cell loss seems to occur during this period (34). We may hypothesize that ROR α 's control of cellular oxidative damage such as those induced by trophic deprivation renders it essential for Purkinje cell survival during development.

More generally ROR α seems to be involved in the cellular stress response network. It has been shown that hypoxia up-regulates expression of the *Rora* gene, which is a target for HIF-1 that acts upon binding to an hypoxia response element (HRE) in its promoter (62). Moreover, an increased expression of the *Rora* gene in cells exposed to a variety of different cellular stresses, including H₂O₂ (63) has been reported. This strongly suggests that ROR α is involved in the response to different stress such as hypoxia and oxidative stress, by regulating a subset of genes involved in the control of oxidative stress.

Oxidative stress is also associated with the progression of neurodegeneration in several pathologies

including Alzheimer's and Parkinson's diseases, and spinocerebellar ataxia. Interestingly, a tie between ROR α and spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1), a polyglutamine repeat expansion disorder, has been proposed in a recent review (64): recent data indicates that ROR α may bind ataxin-1 directly and that ROR α expression levels are decreased in the SCA1 model. Oxidative stress has been shown to increase the cell death in cellular models of SCA1 (65). The decreased expression of ROR α in this model could result in decreased antioxidant actions, which would promote the cell death. It should be noticed that ROR α may intervene in human spinocerebellar ataxia also by other mechanisms: it has been shown recently that ROR α 1 was repressed by expanded ataxin-7, the abnormal protein of the spinocerebellar ataxia type 7 (66).

ROR α , a crucial factor controlling early PC differentiation

Most of the Purkinje cells degenerate in the *Rora*^{sg/sg} cerebellum, but, interestingly, those that survive display immature features. Purkinje cells are in an embryonic state: somata appear smaller than controls (33) (Figure 2), while dendrites are rudimentary and stunted, lacking distal spiny branchlets (67–69). Before their target-related cell death in the *Rora*^{sg/sg} cerebellum (2), granule cells which have been generated seem to differentiate normally. By electronic microscopy, the presence of attachment plates between Purkinje cell dendrites and parallel fibers has been described (70), suggesting that parallel fibers form transient primitive junctions with the Purkinje cell dendritic shaft, but attachment plates then fail to develop into functional synapses (70). In contrast, qualitatively normal dendritic spines and synapses are formed with climbing fibers (33,67–69). However, there is a failure in the developmental regression of the Purkinje cell polyinnervation by climbing fibers (71,72). Other immature and embryonic features remain in the postnatal *Rora*^{sg/sg} cerebellum, such as the persistent expression of embryonic cell surface components (73,74) like embryonic NCAM isoforms (75). Moreover, expression of the late Purkinje cell markers Pcp-2/L7 (19) and calmodulin (76), which normally increases during development, have been shown to be altered in *Rora*^{sg/sg} mice.

All these studies have suggested that the differentiation of the surviving *Rora*^{sg/sg} Purkinje cells is impaired. However, in *Rora*^{sg/sg}, the neurodegeneration begins just after birth, which renders identification of exact Purkinje cell differentiation abnormalities very difficult. Indeed, Purkinje cell differentiation is known to be dependent upon granular cell interaction (77–80). The differentiation of *Rora*^{sg/sg} Purkinje cells has been studied in dissociated (81) or cerebellar organotypic (82)

cultures, in which the differentiation can be observed independently of the neurodegeneration. In both culture types, Purkinje cells display an early postnatal block of the differentiation process, as they did not progress beyond the embryonic shape reminiscent of their migratory morphology (81,82). More precisely, we have shown that Purkinje cells from newborn *Rora*^{sg/sg} cerebella do not undergo the normal regression of embryonic processes; these primitive processes continuing to develop rather than regress, as happens in wild-type Purkinje cells in cerebellar slices (82) and *in vivo* (83). Indeed, Purkinje cells, like other neurons, regress their embryonic bipolar processes prior to developing their ultimate dendritic tree (83). We have further demonstrated that ROR α expression is crucial for the early steps of Purkinje cell differentiation, as lentiviral-mediated hROR α 1 overexpression in wild-type Purkinje cells led to the acceleration of the early steps of differentiation, in particular the first step of dendritic regression (82). Moreover, hROR α 1 expression in Purkinje cells in *Rora*^{sg/sg} cerebellar slices could restore the normal differentiation progression. These results demonstrate that ROR α is a crucial factor controlling early postnatal Purkinje cell differentiation.

In addition to the differentiation abnormalities described *in vivo* in the developing cerebellum of homozygous *Rora*^{sg/sg} mice, others have been described in the ageing cerebellum of heterozygous *Rora*^{+/sg} mutants (84). The effects of the ageing process are apparent in the wild-type Purkinje cell as a dendritic atrophy is observed at 24 months of age. However, in *Rora*^{+/sg} mutants, there is a considerably accelerated dendritic atrophy compared to controls, which is detected as early as 4 months of age in *Rora*^{+/sg} but not until 22 months in *Rora*^{+/+}. The regression of the dendritic arbor not only starts earlier in *Rora*^{+/sg} than in *Rora*^{+/+}, but it is also much more extensive (84). The dendritic atrophy does not seem to be the intracellular consequence of the cell death since dendritic atrophy is still observed after 13 months of age, when the Purkinje cell number does not decrease anymore. However, dendritic atrophy could be an indirect consequence of Purkinje cell death: the resulting granular cell loss in the cortex leads to the loss of the input from the parallel fibers on Purkinje cells which is known to influence dendritic arborization. Nevertheless, in view of the demonstrated role of ROR α on the early dendritic differentiation, we can hypothesize that ROR α also plays a role in the maintenance of the dendritic arborization during ageing. Further studies will be needed to determine whether ROR α could play such a role.

Conclusion

The nuclear receptor ROR α , which plays a major role in the development of many tissues throughout

the organism, appears to be a pivotal nuclear receptor for cerebellar development and ageing, in particular through its effect on Purkinje cell survival and differentiation.

During development, ROR α expression is crucial for the Purkinje cell survival and differentiation. At the level of granule cells, ROR α plays a dual role: first, it directly controls their genesis by controlling their proliferation in the EGL through Shh, and second, ROR α is indirectly necessary for their survival since granule cells undergo target-related cell death in the absence of Purkinje cells. In the adult, ROR α protects Purkinje cells against age-related deleterious effects and ROR α is involved in the maintenance of dendritic arborization of Purkinje cell during ageing.

References

1. Sidman RL, Lane PV, Dickie MM. staggerer, a new mutation in the mouse affecting the cerebellum. *Science*. 1962;136:610–12.
2. Herrup K. Role of staggerer gene in determining cell number in cerebellar cortex. I. Granule cell death is an indirect consequence of staggerer gene action. *Brain Res*. 1983;313:267–74.
3. NRNC. A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell*. 1999;97:161–3.
4. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, et al. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*. 1995;83:835–9.
5. Giguere V. Orphan nuclear receptors: from gene to function. *Endocr Rev*. 1999;20:689–725.
6. Atkins GB, Hu X, Guenther MG, Rachez C, Freedman LP, Lazar MA. Coactivators for the orphan nuclear receptor RORalpha. *Mol Endocrinol*. 1999;13:1550–7.
7. Harris JM, Lau P, Chen SL, Muscat GE. Characterization of the retinoid orphan-related receptor-alpha coactivator binding interface: a structural basis for ligand-independent transcription. *Mol Endocrinol*. 2002;16:998–1012.
8. Kallen JA, Schlaeppli JM, Bitsch F, Geisse S, Geiser M, Delhon I, et al. X-ray structure of the hRORalpha LBD at 1.63 Å: structural and functional data that cholesterol or a cholesterol derivative is the natural ligand of RORalpha. *Structure (Camb)*. 2002;10:1697–707.
9. Giguere V, McBroom LD, Flock G. Determinants of target gene specificity for ROR alpha 1: monomeric DNA binding by an orphan nuclear receptor. *Mol Cell Biol*. 1995;15:2517–26.
10. McBroom LD, Flock G, Giguere V. The nonconserved hinge region and distinct amino-terminal domains of the ROR alpha orphan nuclear receptor isoforms are required for proper DNA bending and ROR alpha-DNA interactions. *Mol Cell Biol*. 1995;15:796–808.
11. Zhao Q, Khorasanizadeh S, Miyoshi Y, Lazar MA, Rastinejad F. Structural elements of an orphan nuclear receptor-DNA complex. *Mol Cell*. 1998;1:849–61.
12. Harding HP, Atkins GB, Jaffe AB, Seo WJ, Lazar MA. Transcriptional activation and repression by RORalpha, an orphan nuclear receptor required for cerebellar development. *Mol Endocrinol*. 1997;11:1737–46.
13. Moraitis AN, Giguere V. Transition from monomeric to homodimeric DNA binding by nuclear receptors: identification of RevErbAalpha determinants required for RORalpha homodimer complex formation. *Mol Endocrinol*. 1999;13:431–9.
14. Giguere V, Tini M, Flock G, Ong E, Evans RM, Otulakowski G. Isoform-specific amino-terminal domains dictate DNA-binding properties of ROR alpha, a novel family of orphan hormone nuclear receptors. *Genes Dev*. 1994;8:538–53.
15. Becker-Andre M, Andre E, DeLamarter JF. Identification of nuclear receptor mRNAs by RT-PCR amplification of conserved zinc-finger motif sequences. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993;194:1371–9.
16. Carlberg C, Hooft van Huijsduijnen R, Staple JK, DeLamarter JF, Becker-Andre M. RZR α , a new family of retinoid-related orphan receptors that function as both monomers and homodimers. *Mol Endocrinol*. 1994;8:757–70.
17. Gold DA, Baek SH, Schork NJ, Rose DW, Larsen DD, Sachs BD, et al. RORalpha coordinates reciprocal signaling in cerebellar development through sonic hedgehog and calcium-dependent pathways. *Neuron*. 2003;40:1119–31.
18. Steinmayr M, Andre E, Conquet F, Rondi-Reig L, Delhaye-Bouchaud N, Auclair N, et al. staggerer phenotype in retinoid-related orphan receptor alpha-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95:3960–5.
19. Hamilton BA, Frankel WN, Kerrebrock AW, Hawkins TL, FitzHugh W, Kusumi K, et al. Disruption of the nuclear hormone receptor RORalpha in staggerer mice. *Nature*. 1996;379(6567):736–9.
20. Besnard S, Heymes C, Merval R, Rodriguez M, Galizzi JP, Boutin JA, et al. Expression and regulation of the nuclear receptor RORalpha in human vascular cells. *FEBS Lett*. 2002;511:36–40.
21. Matsui T, Sashihara S, Oh Y, Waxman SG. An orphan nuclear receptor, mROR alpha, and its spatial expression in adult mouse brain. *Brain Res Mol Brain Res*. 1995;33:217–26.
22. Ino H. Immunohistochemical characterization of the orphan nuclear receptor ROR alpha in the mouse nervous system. *J Histochem Cytochem*. 2004;52:311–23.
23. Matysiak-Scholze U, Nehls M. The structural integrity of ROR alpha isoforms is mutated in staggerer mice: cerebellar coexpression of ROR alpha1 and ROR alpha4. *Genomics*. 1997;43:78–84.
24. Dussault I, Fawcett D, Matthyssen A, Bader JA, Giguere V. Orphan nuclear receptor ROR alpha-deficient mice display the cerebellar defects of staggerer. *Mech Dev*. 1998;70:147–53.
25. Doulazmi M, Frederic F, Capone F, Becker-Andre M, Delhaye-Bouchaud N, Mariani J. A comparative study of Purkinje cells in two RORalpha gene mutant mice: staggerer and RORalpha(-/-). *Brain Res Dev Brain Res*. 2001;127:165–74.
26. Guillaumond F, Dardente H, Giguere V, Cermakian N. Differential control of Bmal1 circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors. *J Biol Rhythms*. 2005;20:391–403.
27. Akashi M, Takumi T. The orphan nuclear receptor RORalpha regulates circadian transcription of the mammalian core-clock Bmal1. *Nat Struct Mol Biol*. 2005;12:441–8.
28. Sato TK, Panda S, Miraglia LJ, Reyes TM, Rudic RD, McNamara P, et al. A functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock. *Neuron*. 2004;43:527–37.
29. Emery P, Reppert SM. A rhythmic Ror. *Neuron*. 2004;43:443–6.
30. Ueda HR, Hayashi S, Chen W, Sano M, Machida M, Shigeyoshi Y, et al. System-level identification of transcriptional circuits underlying mammalian circadian clocks. *Nat Genet*. 2005;37:187–92.
31. Jarvis CI, Staels B, Brugg B, Lemaigre-Dubreuil Y, Tedgui A, Mariani J. Age-related phenotypes in the staggerer mouse expand the RORalpha nuclear receptor's role beyond the cerebellum. *Mol Cell Endocrinol*. 2002;186:1–5.

- 0 32. Boukhtouche F, Mariani J, Tedgui A. The 'CholesterOR' protective pathway in the vascular system. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:637-43.
33. Landis DM, Sidman RL. Electron microscopic analysis of postnatal histogenesis in the cerebellar cortex of staggerer mutant mice. *J Comp Neurol.* 1978;179:831-63.
- 5 34. Vogel MW, Sinclair M, Qiu D, Fan H. Purkinje cell fate in staggerer mutants: agenesis versus cell death. *J Neurobiol.* 2000;42:323-37.
35. Monnier Z, Bahjaoui-Bouhaddi M, Bride J, Bride M, Math F, Propper A. Structural and immunohistological modifications in olfactory bulb of the staggerer mutant mouse. *Biol Cell.* 1999;91:29-44.
- 10 36. Herrup K, Mullen RJ. Staggerer chimeras: intrinsic nature of Purkinje cell defects and implications for normal cerebellar development. *Brain Res.* 1979;178:443-57.
37. Nakagawa S, Watanabe M, Inoue Y. Prominent expression of nuclear hormone receptor ROR alpha in Purkinje cells from early development. *Neurosci Res.* 1997;28:177-84.
- 15 38. Sonmez E, Herrup K. Role of staggerer gene in determining cell number in cerebellar cortex. II. Granule cell death and persistence of the external granule cell layer in young mouse chimeras. *Brain Res.* 1984;314:271-83.
39. Dahmane N, Ruiz-i-Altaba A. Sonic hedgehog regulates the growth and patterning of the cerebellum. *Development.* 1999;126:3089-100.
40. Shojaeian H, Delhaye-Bouchaud N, Mariani J. Decreased number of cells in the inferior olivary nucleus of the developing staggerer mouse. *Brain Res.* 1985;353:141-6.
- 25 41. Blatt GJ, Eisenman LM. A qualitative and quantitative light microscopic study of the inferior olivary complex in the adult staggerer mutant mouse. *J Neurogenet.* 1985;2:51-66.
42. Zanjani HS, Mariani J, Herrup K. Cell loss in the inferior olive of the staggerer mutant mouse is an indirect effect of the gene. *J Neurogenet.* 1990;6:229-41.
- 30 43. Kopmels B, Mariani J, Delhaye-Bouchaud N, Audibert F, Fradelizi D, Wollman EE. Evidence for a hyperexcitability state of staggerer mutant mice macrophages. *J Neurochem.* 1992;58:192-9.
44. Stapleton CM, Jaradat M, Dixon D, Kang HS, Kim SC, Liao G, et al. Enhanced susceptibility of staggerer (RORalphsg) mice to lipopolysaccharide-induced lung inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2005;289:L144-52.
- 35 45. Delerive P, Monte D, Dubois G, Trottein F, Fruchart-Najib J, Mariani J, et al. The orphan nuclear receptor ROR alpha is a negative regulator of the inflammatory response. *EMBO Rep.* 2001;2:42-8.
- 40 46. Vernet-der Garabedian B, Lemaigre-Dubreuil Y, Delhaye-Bouchaud N, Mariani J. Abnormal IL-1beta cytokine expression in the cerebellum of the ataxic mutant mice staggerer and lurcher. *Brain Res Mol Brain Res.* 1998;62:224-7.
- 45 47. Zanjani HS, Mariani J, Delhaye-Bouchaud N, Herrup K. Neuronal cell loss in heterozygous staggerer mutant mice: a model for genetic contributions to the aging process. *Brain Res Dev Brain Res.* 1992;67:153-60.
48. Hadj-Sahraoui N, Frederic F, Zanjani H, Herrup K, Delhaye-Bouchaud N, Mariani J. Purkinje cell loss in heterozygous staggerer mutant mice during aging. *Brain Res Dev Brain Res.* 1997;98:1-8.
- 50 49. Doulazmi M, Frederic F, Lemaigre-Dubreuil Y, Hadj-Sahraoui N, Delhaye-Bouchaud N, Mariani J. Cerebellar Purkinje cell loss during life span of the heterozygous staggerer mouse (Rora(+)/Rora(sg)) is gender-related. *J Comp Neurol.* 1999;411:267-73.
- 55 50. Shojaeian H, Delhaye-Bouchaud N, Mariani J. Decreased number of cells in the inferior olivary nucleus of the adult mouse (+/sg) heterozygous for the staggerer gene. *Neuroscience.* 1987;22:91-7.
51. Sohal RS, Mockett RJ, Orr WC. Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. *Free Radic Biol Med.* 2002;33:575-86.
52. Joseph JA, Denisova NA, Bielinski D, Fisher DR, Shukitt-Hale B. Oxidative stress protection and vulnerability in aging: putative nutritional implications for intervention. *Mech Ageing Dev.* 2000;116:141-53.
- 65 53. Higami Y, Shimokawa I. Apoptosis in the aging process. *Cell Tissue Res.* 2000;301:125-32.
54. Klein JA, Longo-Guess CM, Rossmann MP, Seburn KL, Hurd RE, Frankel WN, et al. The harlequin mouse mutation downregulates apoptosis-inducing factor. *Nature.* 2002;419(6905):367-74.
- 70 55. Boukhtouche F, Vodjdani G, Jarvis CI, Bakouche J, Staels B, Mallet J, et al. Human retinoic acid receptor-related orphan receptor alpha1 overexpression protects neurones against oxidative stress-induced apoptosis. *J Neurochem.* 2006;96:1778-89.
- 75 56. Zanjani HS, Vogel MW, Delhaye-Bouchaud N, Martinou JC, Mariani J. Increased cerebellar Purkinje cell numbers in mice overexpressing a human bcl-2 transgene. *J Comp Neurol.* 1996;374:332-41.
57. Marin-Teva JL, Dusart I, Colin C, Gervais A, van Rooijen N, Mallat M. Microglia promote the death of developing Purkinje cells. *Neuron.* 2004;41:535-47.
- 80 58. Kitao Y, Hashimoto K, Matsuyama T, Iso H, Tamatani T, Hori O, et al. ORP150/HSP12A regulates Purkinje cell survival: a role for endoplasmic reticulum stress in cerebellar development. *J Neurosci.* 2004;24:1486-96.
59. Dusart I, Airaksinen MS, Sotelo C. Purkinje cell survival and axonal regeneration are age dependent: an in vitro study. *J Neurosci.* 1997;17:3710-26.
- 85 60. Ghomari AM, Wehrle R, Bernard O, Sotelo C, Dusart I. Implication of Bcl-2 and Caspase-3 in age-related Purkinje cell death in murine organotypic culture: an in vitro model to study apoptosis. *Eur J Neurosci.* 2000;12:2935-49.
- 90 61. Satoh T, Sakai N, Enokido Y, Uchiyama Y, Hatanaka H. Survival factor-insensitive generation of reactive oxygen species induced by serum deprivation in neuronal cells. *Brain Res.* 1996;733:9-14.
62. Chauvet C, Bois-Joyeux B, Berra E, Pouyssegur J, Danan JL. The gene encoding human retinoic acid-receptor-related orphan receptor alpha is a target for hypoxia-inducible factor 1. *Biochem J.* 2004;384(Pt 1):79-85.
- 95 63. Zhu Y, McAvoy S, Kuhn R, Smith DI. RORA, a large common fragile site gene, is involved in cellular stress response. *Oncogene.* 2006. [1]
64. Gold DA, Gent PM, Hamilton BA. RORalpha in genetic control of cerebellum development: 50 staggering years. *Brain Res.* 2006. [2] 100
65. Kim SJ, Kim TS, Hong S, Rhim H, Kim IY, Kang S. Oxidative stimuli affect polyglutamine aggregation and cell death in human mutant ataxin-1-expressing cells. *Neurosci Lett.* 2003;348:21-4.
- 105 66. Strom AL, Forsgren L, Holmberg M. A role for both wild-type and expanded ataxin-7 in transcriptional regulation. *Neurobiol Dis.* 2005;20:646-55.
67. Bradley P, Berry M. The Purkinje cell dendritic tree in mutant mouse cerebellum. A quantitative Golgi study of Weaver and Staggerer mice. *Brain Res.* 1978;142:135-41.
- 110 68. Sotelo C. Purkinje cell ontogeny: formation and maintenance of spines. *Prog Brain Res.* 1978;48:149-70.
69. Sotelo C. Cerebellar synaptogenesis: what we can learn from mutant mice. *J Exp Biol.* 1990;153:225-49.
- 115 70. Sotelo C. Permanence and fate of paramembranous synaptic specializations in 'mutants' experimental animals. *Brain Res.* 1973;62:345-51.
71. Crepel F, Delhaye-Bouchaud N, Guastavino JM, Sampaio I. Multiple innervation of cerebellar Purkinje cells by climbing

- 0 fibres in staggerer mutant mouse. *Nature*. 1980;283(5746):483-4.
72. Mariani J, Changeux JP. Multiple innervation of Purkinje cells by climbing fibers in the cerebellum of the adult staggerer mutant mouse. *J Neurobiol*. 1980;11:41-50.
73. Hatten ME, Messer A. Postnatal cerebellar cells from staggerer mutant mice express embryonic cell surface characteristic. *Nature*. 1978;276(5687):504-6.
74. Trenkner E. Postnatal cerebellar cells of staggerer mutant mice express immature components on their surface. *Nature*. 1979;277(5697):566-7.
- 10 75. Edelman GM, Chuong CM. Embryonic to adult conversion of neural cell adhesion molecules in normal and staggerer mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1982;79:7036-40.
76. Messer A, Plummer-Siegarth J, Eisenberg B. Staggerer mutant mouse Purkinje cells do not contain detectable calmodulin mRNA. *J Neurochem*. 1990;55:293-302.
- 15 77. Berry M, Bradley P. The growth of the dendritic trees of Purkinje cells in irradiated agranular cerebellar cortex. *Brain Res*. 1976;116:361-87.
78. Bradley P, Berry M. The effects of reduced climbing and parallel fibre input on Purkinje cell dendritic growth. *Brain Res*. 1976;109:133-51.
- 20
79. Bradley P, Berry M. Quantitative effects of climbing fibre deafferentation on the adult Purkinje cell dendritic tree. *Brain Res*. 1976;112:133-40.
80. Baptista CA, Hatten ME, Blazeski R, Mason CA. Cell-cell interactions influence survival and differentiation of purified Purkinje cells in vitro. *Neuron*. 1994;12:243-60.
81. Shirley LT, Messer A. Early postnatal Purkinje cells from staggerer mice undergo aberrant development in vitro with characteristic morphologic and gene expression abnormalities. *Brain Res Dev Brain Res*. 2004;152:153-7.
82. Boukhtouche F, Janmaat S, Vodjdani G, Gautheron V, Mallet J, Dusart I, et al. Retinoid-related orphan receptor alpha controls the early steps of Purkinje cell dendritic differentiation. *J Neurosci*. 2006;26:1531-8.
- 70 83. Armengol JA, Sotelo C. Early dendritic development of Purkinje cells in the rat cerebellum. A light and electron microscopic study using axonal tracing in 'in vitro' slices. *Brain Res Dev Brain Res*. 1991;64:95-114.
84. Hadj-Sahraoui N, Frederic F, Zanjani H, Delhaye-Bouchaud N, Herrup K, Mariani J. Progressive atrophy of cerebellar Purkinje cell dendrites during aging of the heterozygous staggerer mouse (*Rora*(+/sg)). *Brain Res Dev Brain Res*. 2001;126:201-9.
- 75
- 80
- 85
- 90
- 95
- 100
- 105
- 110
- 115