



HAL
open science

Effet du statut en vitamine A sur la voie d'action des glucocorticoïdes et impact sur les processus mnésiques chez le rongeur

Damien Bonhomme

► To cite this version:

Damien Bonhomme. Effet du statut en vitamine A sur la voie d'action des glucocorticoïdes et impact sur les processus mnésiques chez le rongeur. Autre [q-bio.OT]. Université Sciences et Technologies - Bordeaux I, 2013. Français. NNT : 2013BOR14977 . tel-00957462

HAL Id: tel-00957462

<https://theses.hal.science/tel-00957462>

Submitted on 10 Mar 2014

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.

N° d'ordre : 4977

THÈSE

PRÉSENTÉE A

L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 1

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

Par

Damien BONHOMME

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

SPÉCIALITÉ : SCIENCES DES ALIMENTS ET NUTRITION

**EFFET DU STATUT EN VITAMINE A SUR LA VOIE
D'ACTION DES GLUCOCORTICOÏDES ET IMPACT SUR
LES PROCESSUS MNÉSQUES CHEZ LE RONGEUR**

Soutenu le : 19 Décembre 2013

Après avis de :

Mme Carmen SANDI, Professeur, EPFL, Lausanne

Rapporteur

M. Patrick BOREL, Directeur de Recherche, INRA, Marseille

Rapporteur

Devant la commission d'examen formée de :

M. Jacques MICHEAU, Professeur, Université Bordeaux 1

Président

Mme Carmen SANDI, Professeur, EPFL, Lausanne

Rapporteur

M. Patrick BOREL, Directeur de Recherche, INRA, Marseille

Rapporteur

M. Paul HIGUERET, Professeur, IPB, Bordeaux

Examineur

Mme Katia TOUYAROT, MCU, IPB, Bordeaux

Invité

A la femme de ma vie, Marion.
A mes parents.
A mes grands-parents.

AVANT-PROPOS

Cette thèse de doctorat a été réalisée au sein du laboratoire de Nutrition et Neurobiologie Intégrée (NutriNeurO, INRA UMR 1286). Elle a été conduite sous la direction du Professeur Paul HIGUERET et encadrée par Katia TOUYAROT. Ce travail a été financé par une bourse de thèse allouée par la région Aquitaine.

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

LISTE DES PUBLICATIONS

- Touyarot, K., **Bonhomme, D.**, Roux, P., Alfos, S., Lafenêtre, P., Richard, E., Higuieret, P., Pallet, V., 2013. A mid-life vitamin A supplementation prevents age-related spatial memory deficits and hippocampal neurogenesis alterations through CRABP-1. *PLoS One*. **2013 Aug 19;8(8):e72101**.
- **Bonhomme, D.**, Minni, A.M., Alfos, S., Roux, P., Richard, E., Higuieret, P., Moisan, M.P., Pallet, V., Touyarot, K. Vitamin A status regulates glucocorticoid activity in Wistar rats: consequences on cognitive functions and hippocampal neurogenesis? *Front Behav Neurosci*. **2014 Feb 4;8:20**.
- **Bonhomme, D.**, Pallet, V., Dominguez, G., Servant, L., Henkous, N., Higuieret, P., Béracochea, D., Touyarot, K. Retinoic acid modulates intrahippocampal levels of corticosterone in middle-aged mice : consequences on hippocampal plasticity and contextual memory. *Front Aging Neurosci*. **2014 Feb 7;6:6**.

LISTE DES COMMUNICATIONS AFFICHÉES

- Touyarot, K., **Bonhomme, D.**, Roux, P., Chaalal, A., Higuieret, P., Pallet, V. Effects of vitamin A status on stress reactivity and emotional behaviour. *10^e colloque de la Société des Neurosciences, Marseille, France, 24-27 mai 2011.*
- **Bonhomme, D.**, Roux, P., Chaalal, A., Higuieret, P., Pallet, V., Touyarot, K. Effects of vitamin A status on emotional behaviour and spatial memory. *43rd Annual General Meeting of the European Behavioural and Brain Society. Seville, Espagne, Sept 9-12, 2011.*
- **Bonhomme, D.**, Roux, P., Chaalal, A., Higuieret, P., Pallet, V., Touyarot, K. Effects of vitamin A status on emotional behaviour and spatial memory. *Journée de l'Ecole Doctorale, Arcachon, France, 28 mars 2012.*
- **Bonhomme, D.**, Roux, P., Wolff, M., Higuieret, P., Pallet, V., Touyarot, K. Effects of vitamin A deficiency on hippocampal-dependent memory and hippocampal 11betaHSD1 expression. *Federation of European Neurosciences Societies Forum 2012, Barcelona, Espagne, July 14-18, 2012.*
- **Bonhomme, D.**, Roux, P., Wolff, M., Higuieret, P., Pallet, V., Touyarot, K. Effects of vitamin A deficiency on hippocampal-dependent memory and hippocampal 11betaHSD1 expression. *Journée de l'Ecole Doctorale, Arcachon, France, 10 Avril 2013.*
- **Bonhomme, D.**, Touyarot, K., Servant, L., Henkous, N., Higuieret, P., Béracochéa, D., Pallet, V. Retinoic acid restores aged-related cognitive deficits and glucocorticoid signalling pathway alterations. *11^e colloque de la Société des Neurosciences, Lyon, France, 21-24 mai 2013.*

REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abord remercier l'ensemble des membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse. A commencer par le Pr. **Jacques Micheau** pour avoir accepté la présidence de ce jury de thèse. Je tiens également à remercier le Pr. **Carmen Sandi** et le Dr. **Patrick Borel** qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger ce travail.

Je remercie le Dr. **Sophie Layé**, directrice du laboratoire NutriNeurO pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et le Pr. **Véronique Pallet** pour m'avoir accueilli au sein de son équipe «Nutrition, récepteurs nucléaires et vieillissement cérébral». Merci à toutes les deux de m'avoir permis de réaliser ce travail de thèse dans de bonnes conditions.

Je voudrais également remercier mon directeur de thèse le Pr. **Paul Higeret** pour m'avoir fait partager sa grande expérience de la nutrition et en particulier de la vitamine A.

Je tiens à adresser mes plus sincères remerciements à **Katia Touyarot** pour m'avoir encadré durant ces trois années de thèse. Si je regarde derrière moi et que je fais le bilan de ces années, je me dis que je me suis vraiment éclaté scientifiquement, et ça, c'est en grande partie grâce à toi. Tu as toujours su me guider, m'écouter, me comprendre, me soutenir,... Bref, pour tout cela et bien plus encore, je tenais à t'adresser un grand grand grand MERCI et à te dire que je ça a été un énorme bonheur pour moi d'avoir partagé tout ça avec toi.

Je voudrais exprimer toute ma reconnaissance à **Mathieu Wolff** sans qui aujourd'hui je ne serais sûrement pas en train d'écrire ces "quelques" lignes. Merci de m'avoir fait partager ton goût pour la recherche et de m'avoir poussé à continuer après le master. Je dois te dire que je ne regrette rien ! Force est de l'admettre, tu avais raison... une thèse c'est quelque chose d'unique qui vaut le coup d'être vécue.

Je tenais ensuite à remercier **Pascale Roux** dit également "Pascalou". Merci pour tout le travail que tu as fait. Merci de m'avoir fait partager tes expériences en biologie moléculaire et en biochimie. On le sait tous les deux, sans toi et ta bonne humeur quotidienne, ma thèse n'aurait pas été la même.

Je voudrais adresser un grand merci à **Amandine Marie Minni** pour toute l'aide qu'elle m'a apportée. Merci de m'avoir fait partager ton expérience de la CORT et de t'être lancée avec moi dans la courte mais ô combien intense "aventure inhibiteur 11 β -HSD1". C'est également à tes côtés que j'ai fait mes premiers pas dans la rédaction d'articles. Merci pour tes précieux conseils. Je te souhaite tout le bonheur du monde pour l'heureux événement qui arrive...

Un grand merci aux étudiantes qui sont passées par là et qui m'ont fait gagner un temps précieux en acquérant très rapidement de l'autonomie, je pense à **Amina Chaalal** et à **Laure Servant**. Merci les filles, vous avez été d'une efficacité redoutable...

Je tenais également à remercier **Serge Alfos** et **Pauline Lafenêtre** avec qui j'ai vraiment apprécié d'interagir. Serge, tu as toujours su trouver un peu de temps pour me donner de précieux conseils et m'aider à résoudre mes problèmes et je t'en remercie. Pauline, tu es quelqu'un sur qui j'ai toujours pu compter tout au long de ce chemin, toujours prête à faire parTACger ton expérience alors merci... Merci à tous les deux pour votre gentillesse.

Merci à tous les autres membres de l'équipe 2, **Annabelle Redonnet, Nicole Etchamendy, Nathalie Arvy, Jean-Benoît Corcuff, Pascal Barat, Cathy Noël-Suberville, Aline Foury, Jean-Christophe Helbling, Julie Brossaud, Hélène Roumes** avec une mention particulière à **Marie-Pierre Moisan** qui a toujours eu le petit mot gentil de soutien qui va bien avec la circonstance. Sans oublier tous ceux de l'équipe 1, **Muriel Darnaudery, Guillaume Ferreira, Sylvie Vancassel, Corine Joffre, Nathalie Castanon, Agnès Nadjar, Pierre Trifilieff, Lucile Capuron, Anne-Laure Diné, Julie Lasselin, Thomas Larrieu, Charlotte Madore, Jean-Christophe Delpech, Amandine Lepinay, Helen Bayer, Julie Sauvant, Agnès Aubert, Sandra Dexpert et Véronique De Smedt-Peyrusse**

Je voudrais remercier l'ensemble du pôle secrétariat **Julie Desboeuf, Marie-Pierre Manain** et **Stéphanie Dechery** pour leur réactivité exemplaire. Merci également à la "team animalerie" **Mathieu Cadet, Claudine Tridon** et **Philippe Birac** et ses fameuses "Biracqueries" dont lui seul a le secret.

Je voudrais ensuite remercier toutes les personnes avec qui nous avons collaboré en commençant par les membres de l'INICIA, **Daniel Béracochéa, Nadia Henkous** et également **Gaëlle Dominguez** et **Thomas Prévôt** pour leurs précieux conseils sur la microdialyse. Merci

à leur pôle animalerie que je connais depuis quelques années maintenant... **Dominique Panzeri**, **Nathalie Argenta** et **Jennifer Huard** mais également **Angélique Faugère** et **Laurence Decorte** qui ont toujours su me dépanner. Merci aux membres du CBMN de l'équipe de **Jean-Marie Schmitter** et en particulier **Corinne Buré** qui a su se montrer très pédagogue pour me faire découvrir le monde de la "spectro".

Merci à tous les Iterguiens de la planète ITERG du 3^{ème} étage, en particulier **Carole Vaysse**, **Leslie Couédelo**, **Laurence Fonseca**, **Sandrine Djoukitch**, **Emeline Montesinos** avec qui c'est toujours agréable d'interagir, scientifiquement ou pas d'ailleurs !

Mais une thèse c'est aussi...

... 3ans avec presque les mêmes personnes...

...dans le même bureau...

... et forcément ça crée des liens !

Pour commencer, je voudrais remercier **Aurore Thomazeau** qui a fait un petit passage parmi nous. Merci de m'avoir soutenu avec tes sucreries quand mon cerveau en réclamait ! Merci aussi à **Frédéric Tantot** qui partage "ponctuellement" le bureau avec nous. J'espère pour toi qu'un jour tu n'auras plus à pédaler pour avancer...

Je continuerai par remercier les filles du bureau, **Anne Létondor** et **Chloé Boitard** avec qui j'ai partagé des moments de franche rigolade... mais aussi des débats interminables (Ah le hasard et la piscine de Morris... ça te rappelle quelque chose Clo ?). Nous étions tous les trois embarqués dans le même bateau pour la rédaction et je suis heureux d'avoir vécu ça avec vous.

Et enfin, les gars du bureau à commencer par mon frère de barbe **Fabrice Casenave**. Tu sais maintenant que le temps du "régueul bowl" est révolu... pour notre plus grand malheur, je tiens à le souligner ! En revanche, je suis vraiment heureux d'avoir fait votre connaissance à toi, et ta femme, **Sophia**. Heureux que vous soyez entrés dans ma vie ! Vous faites partie d'une des plus belles rencontres qui me soit arrivée durant cette thèse. Et puis quoi ? Je vais être "Tonton" pour la 1^{ère} fois !! Waouhhh !

Viens ensuite tout naturellement le tour de mon second frère (pas "de barbe" lui mais bon...) **Julien Bensalem**. Ah Ju... que dire... on se connaît depuis le master mais c'est comme si on se connaissait depuis toujours... Je suis tellement content que l'on se soit retrouvé durant cette thèse et d'avoir pu partager tous ces moments avec toi... **Célia** est quelqu'un de bien prends-en le plus grand soin mon ami... que dis-je? mon frère !

Pour finir (ou presque), je voudrais remercier mes parents, **Jean-philippe** et **Christine**, qui m'ont toujours dit "fais ce qui te plaît". Alors aujourd'hui, je suis fier de pouvoir vous montrer l'aboutissement de tout ça ! Merci d'avoir cru en moi et de m'avoir soutenu jusqu'au bout. Merci à mes grands-parents maternels, **Eliane** et **Jean**, pour votre soutien inconditionnel (et nutritionnel). Vous m'avez toujours épaulé et encouragé et comme tu le dis souvent mamie, j'ai rien lâché... "A fond, à fond !". Merci aussi mes grands-parents paternels, **Any** et **Paulin** qui eux aussi ont toujours été présents. Merci également à ma belle famille pour leur soutien.

Comme le dit l'expression: "il faut toujours garder le meilleur pour la fin", je tenais à consacrer ce dernier paragraphe à ma femme, **Marion**. Toi qui partages ma vie depuis un peu plus de 9 ans maintenant, je tenais à te remercier pour TOUT avec un grand "T". Tu es ce qui m'est arrivé de plus merveilleux dans la vie et je reste persuadé que sans ton amour pour me porter je n'en serais pas là aujourd'hui. Notre mariage fut le plus beau jour de ma vie et, j'en suis sûr, à tes côtés j'en vivrai encore beaucoup d'autres... Je t'aime.

RESUMÉ

Il est maintenant bien établi que la vitamine A et son métabolite actif l'acide rétinoïque (AR), joueraient un rôle important dans les fonctions cognitives du cerveau adulte. La diminution de l'activité de la voie de signalisation des rétinoïdes et l'augmentation de celle des glucocorticoïdes (GC), se manifestent de manière concomitante au cours du vieillissement et participeraient aux altérations de plasticité et à l'étiologie du déclin cognitif lié à l'âge. De plus, certaines données ont mis en évidence des effets antagonistes de la voie des rétinoïdes sur celle des glucocorticoïdes.

L'objectif de ce travail visait donc à mieux comprendre les interactions entre ces deux voies de signalisation et leur impact sur les processus de plasticité cérébrale et les fonctions mnésiques chez le rongeur. L'approche expérimentale a consisté à étudier les effets d'une supplémentation nutritionnelle en vitamine A ou d'un traitement par l'AR sur le niveau corticostérone plasmatique et hippocampique, sur les mécanismes impliqués dans la biodisponibilité de la corticostérone, sur les processus de plasticité cérébrale (neurogenèse et plasticité synaptique) et sur la mémoire hippocampo-dépendante dans un modèle nutritionnel de carence en vitamine A mais également au cours du vieillissement.

Nous avons montré qu'une carence en vitamine A entraînait une hyperactivation de la voie des glucocorticoïdes se traduisant par une hypersécrétion de corticostérone au niveau périphérique et hippocampique qui pourrait être liée à une diminution de capacité de liaison de la CBG mais également à une hyperactivation de la 11 β -HSD1 au niveau hippocampique. D'autre part, une supplémentation nutritionnelle en vitamine A chez les rats carencés normalise les effets délétères observés sur la voie des glucocorticoïdes et supprime les altérations de neurogenèse hippocampique ainsi que les déficits de mémoire hippocampo-dépendante. De plus, un traitement par l'AR permettrait de moduler positivement la voie de signalisation des rétinoïdes chez la souris d'âge intermédiaire afin de diminuer l'amplitude de libération de corticostérone intrahippocampique, s'opposant ainsi aux effets délétères d'un excès de glucocorticoïdes sur les processus neurobiologiques et cognitifs au cours du vieillissement.

Ce travail contribue à la démonstration d'une modulation de la biodisponibilité des glucocorticoïdes par le statut en vitamine A observée au cours d'une carence en vitamine A et du vieillissement. Il offre de nouvelles perspectives dans le développement d'une prévention du déclin cognitif lié à l'âge axée sur les facteurs nutritionnels tels que la vitamine A.

Mots clés : Supplémentation en vitamine A, Acide rétinoïque, Glucocorticoïdes, Carence en vitamine A, Vieillissement, Neurogenèse, Plasticité synaptique, Mémoire, Hippocampe.

ABSTRACT

It is now established that vitamin A and its active metabolite, retinoic acid (RA), are required for cognitive functions in the adulthood. The hyposignaling of retinoic acid and the hyperactivity of the glucocorticoid (GC) pathway appear concomitantly during aging and both would contribute to the deterioration of hippocampal plasticity and functions. Moreover, recent data have evidenced counteracting effects of retinoids on the GC signaling pathway.

The goal of the present study has been to shed more light on the interactions between both signaling pathways and their consequences on cerebral plasticity and memory processes. We have investigated them not only in a well-established nutritional model of vitamin A deficiency but also during aging. Indeed, our experimental approach has consisted in manipulating the status in vitamin A (deficiency and/or supplementation or RA treatment) in rodents to better understand its impact on plasma and intrahippocampal corticosterone levels and the mechanisms involved in corticosterone bioavailability. Hippocampus-dependent memory and plasticity (adult neurogenesis and synaptic plasticity-related gene expression) have also been assessed.

We have shown a hyperactivity of the glucocorticoid pathway in vitamin A-deficient rats, leading to elevated peripheral and hippocampal corticosterone levels. This is probably due to a decrease in CBG binding capacity and to the hyperactivity of the hippocampal 11β -HSD1. Furthermore, a vitamin A supplementation normalizes glucocorticoid activity and hippocampal neurogenesis levels and corrects memory deficits. Besides, in middle-aged mice, a RA treatment is able to positively modulate the retinoid signaling pathway inducing a decreased hypersecretion of intrahippocampal corticosterone. It thus counteracts the deleterious effects of an excess of glucocorticoids on neurobiological and memory processes.

Altogether, these results contribute to the demonstration that in vitamin A deficiency and during aging, the status in vitamin A modulates GC activity. This work proposes new preventive perspectives based on nutritional factors such as vitamin A in order to delay age-related cognitive decline.

Key words : Vitamin A supplementation, Retinoic acid, Glucocorticoids, Vitamin A deficiency, Aging, Neurogenesis, Cerebral plasticity, Memory, Hippocampus.

SOMMAIRE

Liste des illustrations	9
Liste des abréviations	11
INTRODUCTION	13
DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES	17
CHAPITRE I. GÉNÉRALITÉS SUR L'ACIDE RÉTINOÏQUE ET LES GLUCOCORTICOÏDES	19
<i>I.1. Les rétinoïdes</i>	<i>19</i>
<i>I.1.1. Généralités</i>	<i>19</i>
<i>I.1.2. Métabolisme général et synthèse de l'acide rétinoïque</i>	<i>19</i>
I.1.2.1. Métabolisme général	21
I.1.2.2. Synthèse de l'acide rétinoïque dans la cellule cible	22
<i>I.1.3. Transport vers le cerveau et métabolisme cérébral</i>	<i>24</i>
I.1.3.1. Transport vers le cerveau.....	24
I.1.3.2. Métabolisme cérébral	24
<i>I.2. Les glucocorticoïdes</i>	<i>26</i>
<i>I.2.1. Biosynthèse et métabolisme des glucocorticoïdes</i>	<i>26</i>
I.2.1.1. Biosynthèse des glucocorticoïdes	26
I.2.1.2. Métabolisme des glucocorticoïdes	28
<i>I.2.2. L'axe corticotrope</i>	<i>29</i>
I.2.2.1. Stimulation et libération des glucocorticoïdes	29
I.2.2.2. Transport vers le cerveau.....	30
I.2.2.3. Régulation des niveaux plasmatiques des glucocorticoïdes	32
CHAPITRE II. MODE D'ACTION DE L'ACIDE RÉTINOÏQUE ET DES GLUCOCORTICOÏDES	34
<i>II.1. La superfamille des récepteurs nucléaires</i>	<i>34</i>
<i>II.1.1. Généralités</i>	<i>34</i>
<i>II.1.2. Structure générale des récepteurs nucléaires</i>	<i>36</i>

II.1.3. Les différents types de récepteurs nucléaires des rétinoïdes	37
II.1.4. Les différents types de récepteurs nucléaires des glucocorticoïdes	38
II.1.5. Les éléments de réponse.....	39
II.2. Mode d'action nucléaire de l'acide rétinoïque et des glucocorticoïdes	40
II.2.1. Mode d'action nucléaire de l'acide rétinoïque	40
II.2.2. Mode d'action nucléaire des glucocorticoïdes	40
II.3. Régulation de l'activité transcriptionnelle des récepteurs nucléaires.....	43
II.3.1. Le rôle des cofacteurs de transcription	43
II.3.2. Auto-régulation	45
II.3.3. Hétérodimérisation et hétérorégulation	45
II.4. Distribution tissulaire et cérébrale des récepteurs nucléaires	46
II.4.1. Distribution tissulaire et cérébrale des récepteurs nucléaires à l'AR	46
II.4.1.1. Distribution tissulaire	46
II.4.1.2. Distribution cérébrale.....	47
II.4.2. Distribution tissulaire et cérébrale des récepteurs nucléaires aux glucocorticoïdes.....	48
II.4.2.1. Distribution tissulaire	48
II.4.2.2. Distribution cérébrale.....	48
II.5. Les gènes cibles régulés par l'acide rétinoïque et les glucocorticoïdes.....	48
II.5.1. Rétinoïdes et cerveau adulte	48
II.5.2. Glucocorticoïdes et cerveau adulte	49
II.6. Les récepteurs membranaires.....	51
CHAPITRE III. VITAMINE A, GLUCOCORTICOÏDES ET VIEILLISSEMENT CÉRÉBRAL.....	53
III.1. Mémoire, hippocampe, et plasticité cérébrale au cours du vieillissement.....	53
III.1.1. Hippocampe et processus mnésiques	53
III.1.1.1. La mémoire	53
III.1.1.2. L'hippocampe.....	55
III.1.1.3. Rôle de l'hippocampe	56
III.1.2. Plasticité cérébrale hippocampique et processus mnésiques	58
III.1.2.1. Plasticité synaptique hippocampique et processus mnésiques.....	58
III.1.2.2. Neurogenèse adulte hippocampique et processus mnésiques	63
• Généralités sur la neurogenèse hippocampique	63
• Neurogenèse et mémoire.....	65
III.1.4. Altérations de plasticité cérébrale associées aux déficits mnésiques au cours du vieillissement.....	67
III.1.4.1. Plasticité synaptique au cours du vieillissement	67

III.1.4.2. Neurogenèse au cours du vieillissement	68
III.2. Implication des voies de signalisation de la vitamine A et des glucocorticoïdes dans les processus mnésiques au cours du vieillissement	70
III.2.1. Hyperactivation de la voie de signalisation des glucocorticoïdes et altérations des processus mnésiques au cours du vieillissement	70
III.2.1.1. Hyperactivation de l'axe HPA et conséquences fonctionnelles	70
III.2.1.2. Hyperactivation de la 11 β -HSD1 et conséquences fonctionnelles	73
III.2.2. Effet du statut en vitamine A sur les processus mnésiques	74
III.2.2.1. Altérations du métabolisme de la vitamine A au cours du vieillissement	74
III.2.2.2. Altérations du métabolisme de la vitamine A au cours d'une carence en vitamine A	75
III.2.2.3. Conséquences d'une hypoactivité de la voie de signalisation de la vitamine A sur la plasticité synaptique et les processus mnésiques	76
III.2.2.4. Conséquences d'une hypoactivité de la voie de signalisation de la vitamine A sur la neurogenèse et les processus mnésiques	77
 CHAPITRE IV. INTERACTIONS DES VOIES DE SIGNALISATION DE L'ACIDE RÉTINOÏQUE ET DES GLUCOCORTICOÏDES	80
IV.1. Action des rétinoïdes sur la capacité de liaison des glucocorticoïdes	80
IV.2. Action des rétinoïdes sur l'activité de l'axe HPA	81
IV.3. Action des rétinoïdes sur la 11 β -HSD1	81
IV.4. Action des rétinoïdes sur certains gènes cibles des glucocorticoïdes	82
 OBJECTIFS	83
 MATÉRIELS ET MÉTHODES	89
I. Animaux, régimes et traitements	91
I.1. Animaux	91
I.2. Séries expérimentales	91
I.2.1. Carence en vitamine A	91
I.2.2. Vieillesse	92
I.2.3. Mise au point du dosage de l'AR dans les tissus	93
II. Traitement par l'AR	93
III. Étude du niveau de corticostérone intrahippocampique par microdialyse chez la souris	93
III.1. Chirurgie stéréotaxique	93
III.2. Microdialyse in vivo	93

IV. Test comportementaux.....	94
IV.1. Actimétrie.....	94
IV.2. Open field.....	94
IV.2.1. Open-field carré	94
IV.2.2. Open-field rond	95
IV.3. Labyrinthe en croix surélevé ("Plus-maze").....	96
IV.4. Labyrinthe aquatique de Morris	97
IV.4.1. Dispositif expérimental.....	97
IV.4.2. Protocole expérimental.....	98
IV.5. Conditionnement de peur au contexte	99
IV.5.1. Dispositif expérimental.....	100
IV.5.2. Protocole expérimental.....	100
IV.6. Labyrinthe en Y.....	101
IV.6.1. Dispositif expérimental.....	102
IV.6.2. Protocole expérimental.....	102
IV.7. Test de Discrimination Sérielle Contextuelle (CSD).....	103
IV.7.1. Dispositif expérimental.....	104
IV.7.2. Protocole expérimental.....	104
V. Sacrifices des animaux et préparation des tissus.....	106
VI. Études immunohistochimiques	106
VI.1. Étude de la neurogenèse	106
VI.1.1. Immunohistochime : marquage DCX.....	106
VI.1.2. Déshydratation et montage des coupes.....	107
VI.1.3. Comptage du nombre de cellules immunoréactives.....	107
VI.2. Vérification de l'implantation des guides-canules.....	107
VII. Études de biologie moléculaire : Quantification des ARNm par RT-qPCR en temps réel.....	108
VII.1. Extraction des ARNs.....	108
VII.2. Rétro-transcription.....	108
VII.3. Amplification.....	108
VII.4. Quantification relative de l'expression des gènes étudiés	109
VIII. Études Biochimiques.....	112
VIII.1. Dosage de la corticostérone plasmatique et de la CBG.....	112
VIII.1.1. Corticostérone plasmatique totale	112
VIII.1.2. Corticostérone plasmatique libre	112
VIII.1.3. Capacité de liaison de la CBG.....	112
VIII.2. Dosage de la corticostérone intrahippocampique.....	113

VIII.2.1. A partir de la structure cérébrale.....	113
VIII.2.2. A partir microdialysats	113
VIII.3. Dosage de l'activité enzymatique de la 11 β -HSD1	113
VIII.4. Dosage du rétinol sérique	114
IX. Analyses statistiques.....	114
PARTIE I.....	115
EFFET D'UNE CARENCE ET D'UNE SUPPLÉMENTATION EN VITAMINE A SUR LA VOIE D'ACTIVITÉ DES GLUCOCORTICOÏDES ET CONSÉQUENCES SUR LA NEUROGENÈSE ET LES PROCESSUS ÉMOTIONNELS ET MNÉSQUES.....	117
<i>I. Introduction.....</i>	<i>117</i>
<i>II. Méthodologie</i>	<i>118</i>
<i>III. Principaux résultats.....</i>	<i>118</i>
<i>IV. Conclusion</i>	<i>119</i>
ARTICLE 1.....	121
CARACTÉRISATION COMPORTEMENTALE APPROFONDIE DU MODÈLE DE CARENCE EN VITAMINE A.....	135
<i>I. Introduction.....</i>	<i>135</i>
<i>II. Méthodologie</i>	<i>135</i>
<i>III. Résultats</i>	<i>136</i>
<i>III.1. Effet d'une carence en vitamine A de 10 semaines sur l'activité locomotrice basale</i>	<i>136</i>
<i>III.2. Effet d'une carence en vitamine A de 10 semaines sur l'activité exploratoire .</i>	<i>137</i>
<i>III.3. Effet d'une carence en vitamine A de 12 semaines et d'une supplémentation en vitamine A de 2 semaines sur la mémoire de peur conditionnée au contexte.....</i>	<i>139</i>
<i>III.4. Effet d'une carence en vitamine A de 14 semaines et d'une supplémentation en vitamine A de 4 semaines sur la mémoire spatiale hippocampo-dépendante évaluée dans la labyrinthe en Y.....</i>	<i>140</i>
<i>IV. Conclusion, Perspectives.....</i>	<i>141</i>
PARTIE II	143
EFFET D'UNE SUPPLÉMENTATION EN VITAMINE A OU D'UN TRAITEMENT PAR L'ACIDE RÉTINOÏQUE SUR LA VOIE D'ACTIVITÉ DES GLUCOCORTICOÏDES ET CONSÉQUENCES SUR LA PLASTICITÉ SYNAPTIQUE ET LES PROCESSUS MNÉSQUES AU COURS DU VIEILLISSEMENT.....	145

I. Introduction.....	145
II. Méthodologie	146
III. Principaux résultats.....	147
IV. Conclusion	147
ARTICLE 2.....	149
ARTICLE 3.....	161
PARTIE III.....	175
EFFET DE L'APPORT ALIMENTAIRE EN VITAMINE A SUR LA SYNTHÈSE D'ACIDE RÉTINOÏQUE DANS LES STRUCTURES CÉRÉBRALES : MISE AU POINT DU DOSAGE DE L'ACIDE RÉTINOÏQUE DANS LES TISSUS BIOLOGIQUES	177
I. Introduction.....	177
II. Matériels et Méthodes	179
II.1. Animaux et sacrifices.....	179
II.2. Principe de la méthode	179
II.2.1. Principe de l'extraction de l'AR.....	180
II.2.2. Principe de la chromatographie en phase liquide à haute performance	180
II.2.3. Principe de la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS).....	181
III. Résultats : Mise au point	183
III.1. Mise au point et optimisation des paramètres en MS/MS	183
III.2. Mise au point et optimisation des paramètres en CLHP.....	186
III.3. Mise au point de l'extraction de l'AR tissulaire	189
IV. Perspectives	194
DISCUSSION GÉNÉRALE	195
I. Résumé des principaux résultats	198
I.1. Première étude : effet d'une carence et d'une supplémentation en vitamine A sur la voie d'activité des glucocorticoïdes et conséquences sur la neurogenèse et les processus émotionnels et mnésiques.....	198
I.2. Deuxième étude : effet d'une supplémentation en vitamine A ou d'un traitement par l'AR sur la voie d'activité des glucocorticoïdes et conséquences sur la plasticité synaptique et les processus mnésiques au cours du vieillissement.....	199
II. Effet du statut en vitamine A sur la voie d'action des glucocorticoïdes dans le modèle de carence en vitamine A.....	200

<i>II.1. Effet du statut en vitamine A sur le niveau de corticostérone plasmatique et hippocampique.....</i>	<i>200</i>
II.1.1. Statut en vitamine A, CBG et axe corticotrope	201
II.1.2. Statut en vitamine A et 11 β -HSD1 au niveau de l'hippocampe.....	202
<i>II.2. Conséquences d'une augmentation de corticostérone intrahippocampique sur la plasticité cérébrale et les processus mnésiques dépendants de l'hippocampe.</i>	<i>203</i>
II.2.1. Statut en vitamine A, glucocorticoïdes et processus mnésiques	203
II.2.2. Statut en vitamine A, glucocorticoïdes et neurogenèse	204
<i>II.3. Perspectives.....</i>	<i>205</i>
<i>III. Effet du statut en vitamine A sur la voie d'action des glucocorticoïdes au cours du vieillissement.....</i>	<i>206</i>
III.1. <i>Effet d'une stimulation de la voie des rétinoïdes sur la mémoire contextuelle dans le test du CSD et les processus de plasticité synaptique chez la souris d'âge intermédiaire</i>	<i>206</i>
III.1.1. Vitamine A et mémoire au cours du vieillissement	206
III.1.2. Vitamine A et plasticité synaptique au cours du vieillissement.....	207
III.2. <i>Effet d'un traitement par l'AR sur la libération de corticostérone hippocampique chez la souris d'âge intermédiaire : conséquences sur la mémoire sérielle contextuelle ?.....</i>	<i>208</i>
III.3. <i>Perspectives</i>	<i>209</i>
<i>IV. Conclusion générale et perspectives thérapeutiques</i>	<i>210</i>

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... 213

Liste des illustrations

DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES

- Figure 1* : Formules chimiques de quelques rétinoïdes.
Figure 2 : Métabolisme général de la vitamine A.
Figure 3 : Voie de signalisation cellulaire de l'acide rétinoïque.
Figure 4 : Anatomie de la glande surrénale.
Figure 5 : Biosynthèse des glucocorticoïdes.
Figure 6 : Métabolisme intracellulaire des glucocorticoïdes.
Figure 7 : Axe HPA et glucocorticoïdes.
Figure 8 : Structure et classification de la superfamille des récepteurs nucléaires.
Figure 9 : Architecture des récepteurs nucléaires.
Figure 10 : Homologie de structure des RAR et RXR chez l'homme.
Figure 11 : Mode d'action de l'acide rétinoïque.
Figure 12 : Mode d'action des glucocorticoïdes.
Figure 13 : Exemple d'interactions récepteurs/cofacteurs avec l'acide rétinoïque.
Figure 14 : Classification des systèmes de la mémoire à long terme.
Figure 15 : La Formation hippocampique.
Figure 16 : Mécanismes d'action de la PLT.
Figure 17 : La neurogenèse hippocampique.
Figure 18 : Modèle de fonctionnement de l'axe HPA chez le rat jeune et âgé.

Tableau 1 : Concentrations en acide rétinoïque, rétinol, rétinol et rétinyl ester dans différents organes et structures cérébrales.

Tableau 2 : Répartition des protéines de liaison et des récepteurs à l'AR dans le cerveau.

Tableau 3 : Quelques gènes régulés par l'acide rétinoïque.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

- Figure 19* : Procédure comportementale dans les Open-field.
Figure 20 : Procédure comportementale dans le labyrinthe en croix surélevé.
Figure 21 : Procédure comportementale dans le labyrinthe aquatique de Morris.
Figure 22 : Procédure comportementale dans le conditionnement de peur au contexte.
Figure 23 : Procédure comportementale dans le labyrinthe en Y.
Figure 24 : Procédure comportementale dans le test de discrimination sérielle et contextuelle (CSD).

Tableau 4 : Séquences des amorces utilisées.

PARTIE I

Figure 25 : Protocole expérimental mis en œuvre.

Figure 26 : Effet du statut en vitamine A sur l'activité locomotrice basale.

Figure 27 : Effet du statut en vitamine A sur l'activité exploratoire.

Figure 28 : Effet du statut en vitamine A sur le conditionnement de peur au contexte.

Figure 29 : Effet du statut en vitamine A sur la mémoire spatiale.

PARTIE III

Figure 30 : Principe de la chromatographie en phase liquide à haute performance.

Figure 31 : Principe de la spectrométrie de masse.

Figure 32 : Spectres de masse obtenus après infusion directe d'AR all-*trans*.

Figure 33 : Méthode en CL-SM/SM.

Figure 34 : Spectres de masse des échantillons issus de solutions commerciales.

Figure 35 : Spectres de masse des échantillons issus de tissus biologiques de rat.

Liste des abréviations

11β-HSD1	11 beta-hydroxystéroïde déshydrogénase de type 1
11β-HSD2	11 beta-hydroxystéroïde déshydrogénase de type 2
Aβ	Beta amyloïde
ACN	Acétonitrile
ACTH	Adrenocorticotrophin hormone
ACTHR	Adrenocorticotrophin hormone receptor
ADH	Alcohol déshydrogénase
ALH	Aldehyde déshydrogénase
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ARAT	Acyl-CoA Rétinol Acyl-Transférase
AVP	Arginine Vasopressine
BDNF	Brain Derived Neurotrophic Factor
CA	Corne d'Ammon
CBG	Corticosteroid Binding Globulin
CE	Collision energy
CFC	Contextual Fear Conditioning
CLHP	Chromatographie Liquide à Haute Performance
CORT	Corticosterone
CRABP	Cellular Retinoic Acid Binding Protein
CRBP	Cellular Retinol Binding Protein
CRH	Corticotropin releasing hormone
CRHR	Corticotropin releasing hormone receptor
CSD	Contextual Serial Discrimination
ER	Estrogen receptor
FH	Formation hippocampique
DR	Direct repeat : motif en répétition directe
GABA	Gamma-aminobutyric acid
GAP43	Neuromoduline
GD	Gyrus Dentelé
GC	Glucocorticoïde
GR	Glucocorticoid receptor
GRE	Glucocorticoid Response Element
HPA	Hypothalamic-Pituitary-Adrenal axis
HRE	Hormone Response Element
Hsp	Heat shock protein
LRAT	Lécithine Rétinol Acyl-Transférase

MR	Mineralocorticoid receptor
MRM	Multiple Reaction Monitoring
NGF	Nerve Growth Factor
nGRE	negative Glucocorticoid Response Element
PLT	Plasticité à Long Terme
POMC	Proiomélanocortine
PVN	Paraventricular nucleus
RAR	Retinoic Acid Receptor
RARE	Retinoic Acid Response Element
RBP	Retinol Binding Protein
RC3	Neurogranine
RCPG	Récepteur couplé aux protéines G
RDH	Retinol dehydrogenase
RXR	Retinoid X Receptor
SM	Spectrométrie de masse
SRD	Short-chain dehydrogenase/reductase
T3	Triiodothyronin
TF	Transcription Factor
TR	Triiodothyronin receptor
TrkA	Récepteur au NGF
TrkB	Récepteur au BDNF
TTR	Transthyrétine
VAD	Vitamin A Deficiency
VDR	Vitamin D3 receptor
VR	Arginine Vasopressine receptor
ZSV	Zone sous ventriculaire

INTRODUCTION

L'un des axes de recherche du laboratoire NutriNeurO vise à mieux comprendre les conséquences d'une modulation du statut en vitamine A sur les processus cognitifs au cours du vieillissement normal. Dans ce travail, nous aborderons plus particulièrement les relations entre la voie de signalisation de la vitamine A et celle des glucocorticoïdes au cours d'un modèle nutritionnel de carence en vitamine A ainsi qu'au cours du vieillissement normal chez le rongeur. Ces travaux s'inscrivent dans une démarche scientifique dont le but sera de définir les principes d'une nutrition destinée à ralentir ou prévenir certaines atteintes cognitives du sujet âgé.

Le vieillissement est un processus multifactoriel dont les conséquences au niveau cérébral constituent des déterminants majeurs de la dépendance du sujet âgé. L'étude PAQUID (QUID des Personnes Agées) estime que 17% des personnes âgées de 75 ans et plus sont atteintes de démence (Ramaroson et al., 2003), ce qui représenterait environ 870 000 cas actuellement en France avec une incidence de 220 000 nouveaux cas par an (source : rapport à l'Office Parlementaire pour l'Evaluation des Politiques de Santé, juin 2005). Ces chiffres sont à prendre en considération étant donné qu'une étude prévisionnelle a estimé que le nombre de sujets atteints de démence va augmenter d'environ 75% entre 2010 et 2030 (dont 200% d'augmentation après l'âge de 90ans) en France (Jacqmin-Gadda et al., 2013). Il n'y a pas de causes clairement définies permettant d'expliquer l'apparition des démences, mais elles pourraient être la résultante d'une combinaison de plusieurs facteurs de risques génétiques et environnementaux propres à chaque individu.

Avant la survenue du stade de démence irréversible, le déclin cognitif progressif va se manifester par des atteintes cognitives légères qui vont concerner environ 15 à 20% de la population âgée de 65 ans et plus, mais qui traduisent un état instable encore potentiellement améliorable dans son évolution naturelle par la mise en place d'une prévention secondaire (Petersen, 2004). Une prévention primaire quant à elle, exercée durant la phase asymptomatique, permettrait d'agir en modulant certains facteurs de risque liés à l'alimentation. Dans ce contexte, afin de prévenir et de retarder la détérioration des processus cognitifs, une stratégie nutritionnelle qui favoriserait le maintien d'un état cognitif satisfaisant chez les sujets âgés, pourrait être mis en place.

Les mécanismes neuronaux de la mémoire épisodique chez l'Homme et de la mémoire spatiale chez l'animal peuvent être mis en parallèle. En effet, ils nécessitent tous deux une intégration coordonnée d'informations séquentielles dans un contexte spatiotemporel donné.

Ce type de mémoire, dépendant d'une structure cérébrale, l'hippocampe, serait fortement altéré au cours du vieillissement. D'autre part, notre équipe a mis en évidence un rôle clé de la baisse d'activité cellulaire de la vitamine A dans l'étiologie de déficits mnésiques hippocampiques associés au vieillissement (Etchamendy et al., 2001). De plus, nous avons montré qu'un traitement par l'acide rétinoïque (AR, métabolite actif de la vitamine A) ou une supplémentation nutritionnelle en vitamine A chez les animaux adultes permettait de prévenir des troubles mnésiques liés au vieillissement (Mingaud et al., 2008; Touyarot et al., 2013). Enfin, le rôle de la vitamine A dans les processus de mémoire dépendants de l'hippocampe a été conforté par les résultats obtenus avec le modèle nutritionnel de carence en vitamine A chez le rongeur qui entraîne une hypoactivité de la voie de signalisation de la vitamine A comme observé au cours du vieillissement (Etchamendy et al., 2003b; Bonnet et al., 2008). De manière similaire, les effets délétères observés sur la mémoire chez le rongeur ont été réversés par un traitement à l'AR.

Associée à cette hypoactivation de la voie de signalisation de la vitamine A, il a été mis en évidence une hyperactivation de l'axe hypothalamo-hypophysaire (HPA) conduisant à un excès des niveaux de glucocorticoïdes circulants (cortisol chez l'homme et corticostérone chez le rongeur) chez certains individus âgés, et qui pourrait être à l'origine de certains troubles émotionnels et mnésiques (Swaab et al., 2005; Hinkelmann et al., 2009; Yau and Seckl, 2012).

Ainsi, une diminution de l'activité de la voie de signalisation des rétinoïdes associée à une augmentation de l'activité des glucocorticoïdes participeraient de manière concomitante à l'étiologie du déclin cognitif lié à l'âge. De plus, quelques études font état d'interactions entre ces deux voies de signalisation et montrent notamment une action inhibitrice des rétinoïdes sur l'activité des glucocorticoïdes (Paez-Pereda et al., 2001; Aubry and Odermatt, 2009; Arvy et al., 2013; Brossaud et al., 2013).

Dans ce contexte, notre hypothèse de travail suggère qu'une baisse d'activité de la vitamine A, survenant naturellement au cours du vieillissement ou induite par le modèle nutritionnel de carence en vitamine A, contribuerait à une augmentation de l'activité des glucocorticoïdes et affecterait les processus neurobiologiques et cognitifs chez le rongeur. En revanche, une supplémentation en vitamine A ou un traitement pharmacologique par l'AR permettrait de maintenir l'action inhibitrice de la voie de signalisation des rétinoïdes sur celle des glucocorticoïdes, s'opposant ainsi à leurs effets délétères sur les processus neurobiologiques et cognitifs.

DONNÉES
BIBLIOGRAPHIQUES

CHAPITRE I. GÉNÉRALITÉS SUR L'ACIDE RÉTINOÏQUE ET LES GLUCOCORTICOÏDES

I.1. Les rétinoïdes

I.1.1. Généralités

La vitamine A (ou rétinol) est un micronutriment liposoluble impliqué dans de nombreuses fonctions biologiques telles que le développement embryonnaire, les processus de croissance cellulaire, la vision ou encore l'immunité (Maden and Hind, 2003). Elle est apportée à l'organisme sous la forme de différents précurseurs présents dans notre alimentation. Les produits d'origine animale (huile de foie de poissons, viande, lait entier, fromage, œuf...) contiennent des esters de rétinol, les végétaux (fruits et légumes) contiennent essentiellement des provitamines A (ou caroténoïdes). Il est nécessaire de bien contrôler les apports en vitamine A car un apport insuffisant (hypovitaminose) ou excessif (hypervitaminose) peut entraîner des effets néfastes à long terme et ainsi être la cause de diverses pathologies. Dans les pays en voie de développement, les carences en vitamine A causées par la malnutrition (ou sous-nutrition) constituent un problème majeur de santé publique concernant « plus d'un tiers des enfants d'âge préscolaire dans le monde » (*source : OMS*). Les altérations développementales et visuelles ne sont pas les seules conséquences de la carence, en effet, il est actuellement bien établi que la vitamine A joue un rôle essentiel dans les processus cognitifs (Lane and Bailey, 2005).

I.1.2. Métabolisme général et synthèse de l'acide rétinoïque

La vitamine A compte de nombreux dérivés métaboliques, composés naturels ou analogues synthétiques, rassemblés sous le terme de "rétinoïdes", parmi lesquels certains sont illustrés sur la *figure 1*. Dans la cellule cible, un métabolisme oxydatif conduit à la production de rétinal à partir de rétinol, qui peut ensuite être converti de manière irréversible en acide rétinoïque (AR). La fonction alcool (-OH) du rétinol peut également être estérifiée par un acide gras, pour former des esters de rétinol, ou rétinyl esters constituant la forme de stockage de la vitamine A dans l'organisme. Ainsi les principaux métabolites actifs de la vitamine A sont le rétinal, molécule essentielle pour la vision, et l'AR (acide 9-*cis* rétinoïque et acide

tout-*trans* rétinol), puissant régulateur de l'expression génique. Outre leurs rôles dans la physiologie de la cellule normale, les rétinoïdes possèdent des propriétés thérapeutiques. A titre d'exemple, l'acide 13-*cis* rétinol, composé synthétique, est utilisé en dermatologie dans le traitement de l'acné, sous le nom d'Accutane™ (Bershad, 2001).

Les molécules de la famille des rétinoïdes possèdent des similitudes de structure et de fonction. Leur structure isoprénique leur confère un caractère lipophile qui nécessite des protéines de liaison spécifiques, permettant le transport, le stockage et le métabolisme des rétinoïdes en molécules biologiquement actives. La structure particulière de chaque rétinoïde, liée à la fonction (alcool, aldéhyde ou acide) portée par la chaîne latérale et à la configuration des doubles liaisons (*cis* ou *trans*) qu'elle comporte, leur fournit une certaine spécificité d'activité. En solution, l'isomérisation (*cis/trans*) peut être induite par différents facteurs comme la lumière ou l'oxygène. Des précautions particulières doivent alors être prises lors de la manipulation et de l'analyse de ces composés (Aust et al., 2001).

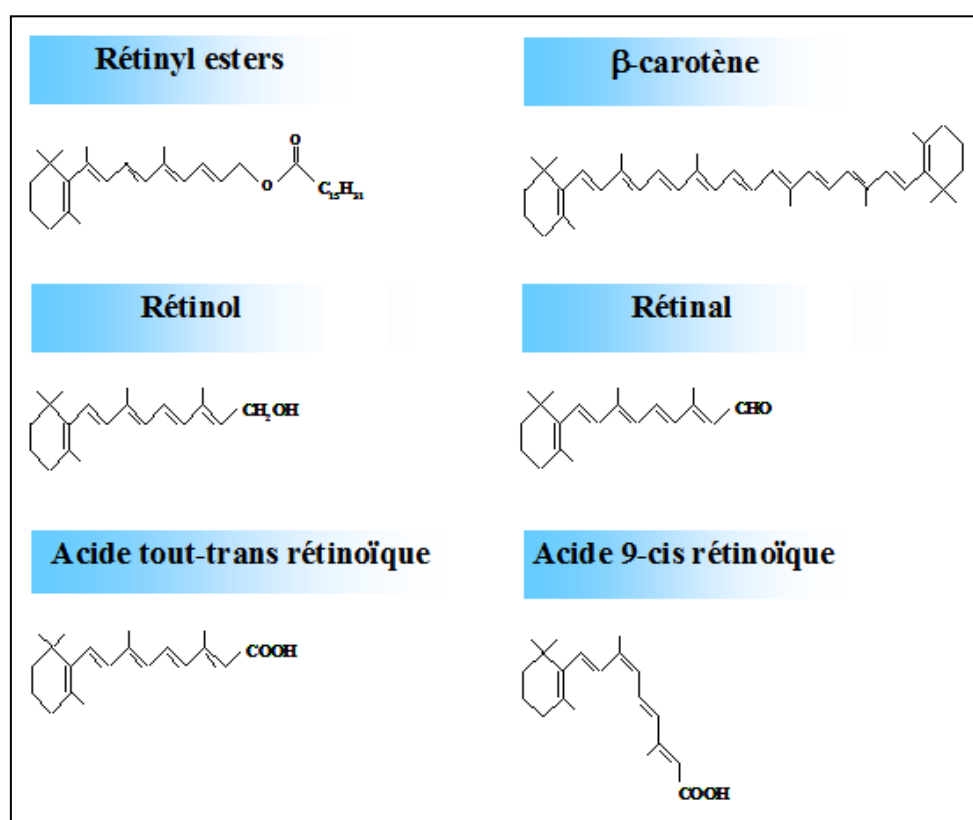


Figure 1. Formules chimiques de quelques rétinoïdes.

I.1.2.1. Métabolisme général

La vitamine A est apportée à l'organisme sous forme d'esters de rétinol par des produits d'origine animale : l'huile de foie de poissons, la viande, le lait entier, le beurre, les œufs, les fromages, etc. Les végétaux contiennent essentiellement des provitamines A, appelés caroténoïdes, qui sont des précurseurs que l'organisme est capable de transformer en rétinol au niveau de l'intestin. Les rétinoïdes apportés par l'alimentation sont ensuite absorbés au niveau de la muqueuse intestinale par les entérocytes. Dans ces cellules, ils sont métabolisés en rétinyls esters ou en rétinol, en fonction des besoins de l'organisme. Lorsque le statut en vitamine A est satisfaisant, ils sont transformés en rétinyls esters, puis stockés au niveau du foie. Dans le cas où l'organisme est en déficience, le rétinol n'est pas stocké mais directement utilisé dans les tissus cibles (Ross et al., 2001).

Le métabolisme de la vitamine A (*Figure 2*) peut se décomposer en 3 étapes :

- *L'absorption intestinale.* A dose physiologique, 80 à 90% de la vitamine A et 50 à 60% des caroténoïdes de la ration alimentaire sont absorbés. Dans la muqueuse intestinale, les caroténoïdes pro-vitaminiques A sont convertis en rétinol. Ce dernier nouvellement formé ainsi que celui apporté par l'alimentation peuvent ensuite être directement libérés dans la circulation sanguine ou estérifiés en rétinyls esters *via* deux enzymes : la LRAT : Lécithine Rétinol Acyl-Transférase ou l'ARAT : Acyl-CoA Rétinol Acyl-Transférase. Le transport des rétinyls esters de la muqueuse intestinale jusque dans le foie est assuré par les chylomicrons (Harrison and Hussain, 2001).

- *Le métabolisme hépatique.* 90% de la vitamine A de l'organisme est mis en réserve dans les cellules Ito. En fonction des besoins de l'organisme, les rétinyls esters seront hydrolysés en rétinol qui sera libéré dans le plasma (Blaner et al., 1994). Le flux de rétinol libéré par le foie est très finement régulé de manière à maintenir une concentration constante de rétinol dans le plasma (1 à 2 μ M). Au delà des besoins immédiats, la vitamine A alimentaire sert à constituer des réserves hépatiques qui seront ensuite utilisées au cours des périodes d'apports insuffisants (Theodosiou et al., 2010).

- *La mobilisation et le transport de la vitamine A.* Le rétinol est acheminé dans le plasma jusqu'aux tissus cibles par un complexe protéique composé de la RBP (Retinol Binding Protein) et de la TTR (Transthyréthine) (Monaco, 2000). L'entrée du rétinol dans les tissus cibles se fait soit par diffusion passive, soit *via* le récepteur membranaire STRA6, qui lie le complexe RBP/TTR (Kawaguchi et al., 2007; Shearer et al., 2012).

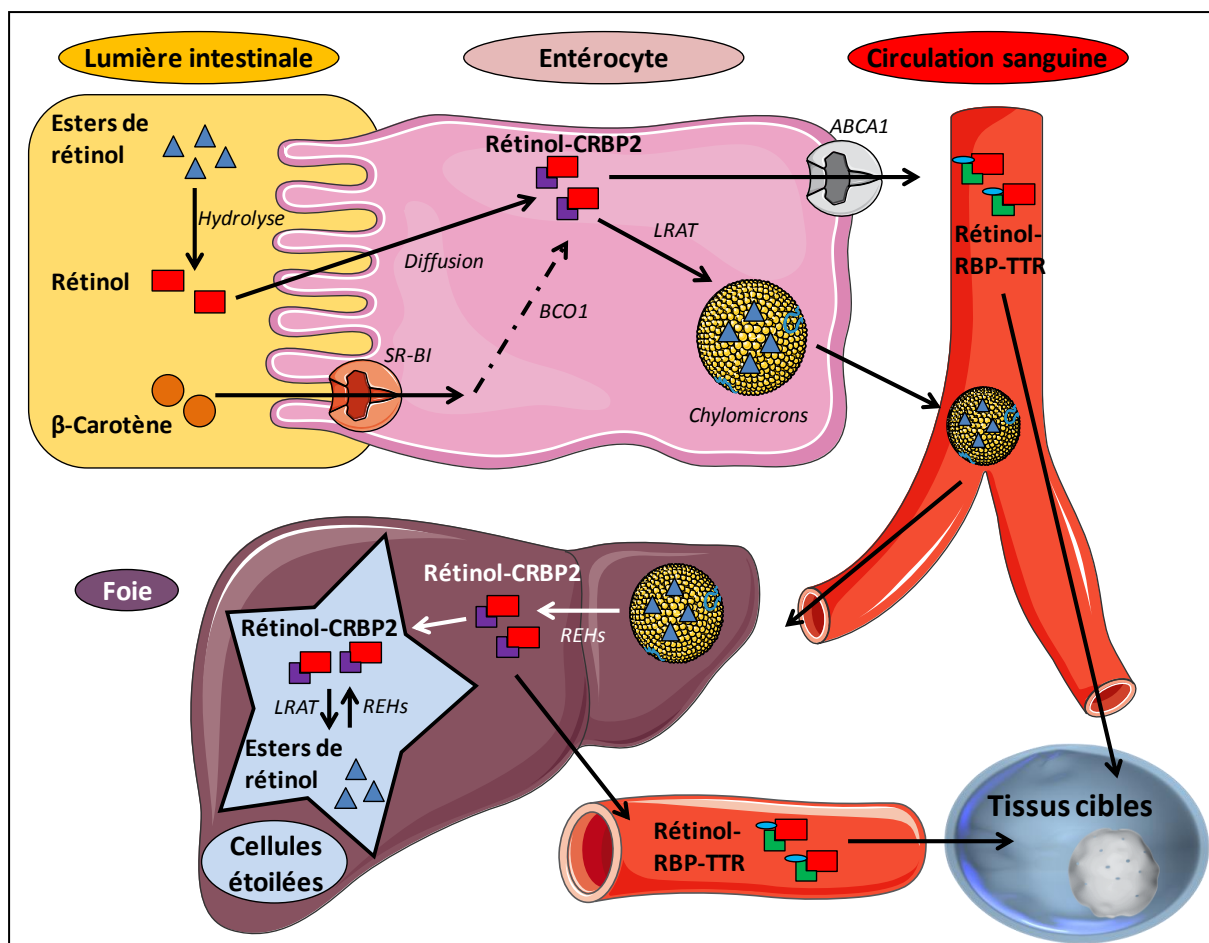


Figure 2 : Métabolisme général de la vitamine A.

I.1.2.2. Synthèse de l'acide rétinoïque dans la cellule cible

L'acide rétinoïque est le métabolite actif de la vitamine A, il n'est présent qu'en très faible quantité dans le sang. Il est donc principalement métabolisé au niveau des tissus cibles à partir de rétinol ou de rétinyl esters (*Figure 3*). Dans le cytoplasme, le rétinol va subir successivement deux métabolismes oxydatifs avant d'être transformé en acide rétinoïque. La première oxydation est un processus réversible qui consiste à transformer le rétinol en rétinol (ou rétinolaldéhyde). Cette réaction est catalysée par des enzymes appelées rétinol déshydrogénases (RDH). Ces RDH peuvent ainsi appartenir à la famille des alcools déshydrogénases (ADH), enzymes cytosoliques, ou à la famille des déshydrogénases/réductases à chaînes courtes (SDR), enzymes microsomiales (Pares et al., 2008). La seconde oxydation est un processus irréversible qui consiste à convertir le rétinol en acide rétinoïque. Cette réaction est catalysée par des enzymes cytosoliques appelées

aldéhydes déshydrogénases (ALDH) ou encore rétinaldéhydes déshydrogénases (RALDH) pour celles identifiées comme spécifique de la synthèse de l'AR (Duester, 2000, 2008; Kumar et al., 2012). Par ailleurs, il a également été montré, *in vitro*, qu'une variété de cytochromes P450 (CYP) étaient impliqués dans l'oxydation microsomale du rétinal en AR (Zhang et al., 2000).

Dans la cellule, le rétinal et le rétinol sont transportés par des protéines de transport appelées CRBP (Cellular Retinol Binding Protein). Après sa synthèse, l'AR est pris en charge dans la cellule cible par la CRABP (Cellular Retinoic Acid Binding Protein) il peut alors exercer des actions génomiques ou non génomiques dans la cellule cible, diffuser vers d'autres cellules adjacentes ou encore être catabolisé par le cytochrome CYP26 (Petkovich, 2001). Toutes ces actions vont participer à la régulation de la voie de signalisation des rétinoïdes dans la cellule (Shearer et al., 2012).

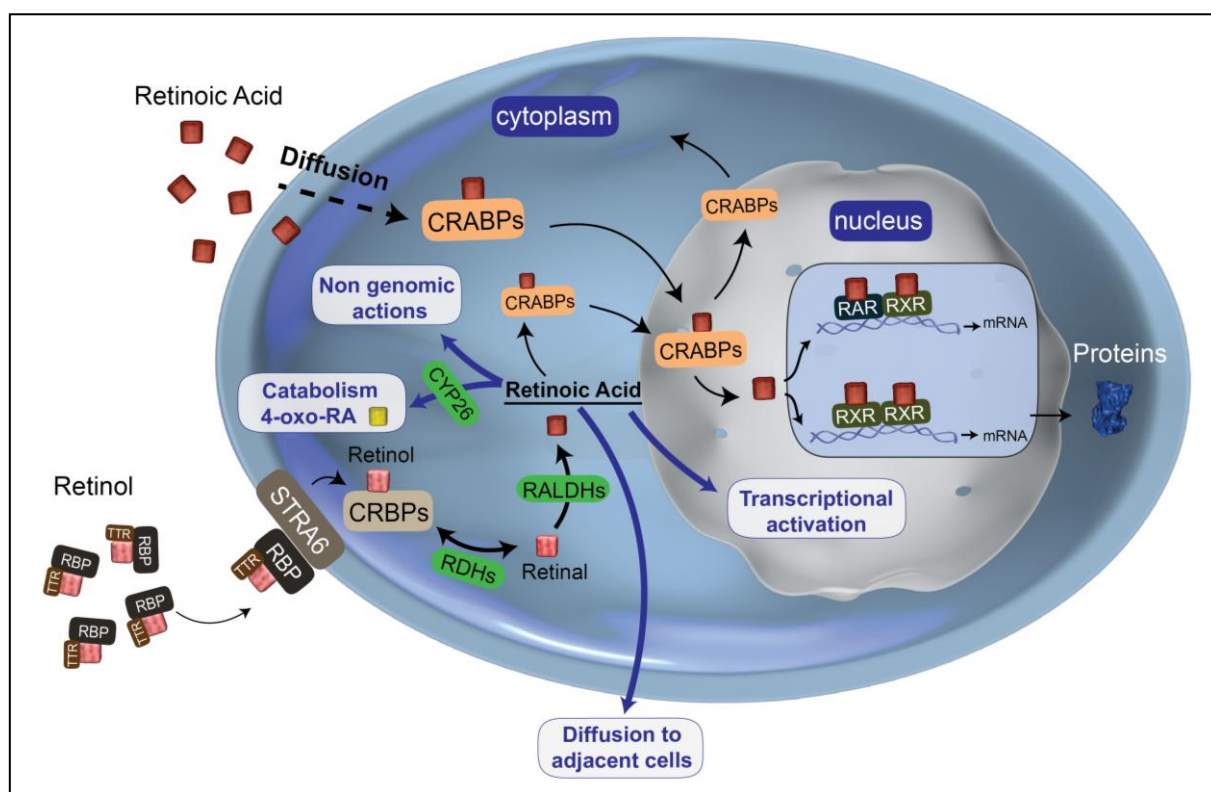


Figure 3 : Voie de signalisation cellulaire de l'acide rétinoïque.

1.1.3. Transport vers le cerveau et métabolisme cérébral

Des études couplant les techniques d'CLHP (Chromatographie Liquide à Haute Performance) et de spectrométrie de masse (SM/SM) ont permis de quantifier l'AR dans le sang, le cerveau entier ainsi que dans les différentes structures cérébrales telles que l'hippocampe, le cortex, le striatum, le cervelet, le thalamus ou encore les bulbes olfactifs (Kane et al., 2005; Kane et al., 2008a; Kane et al., 2008b; Kane and Napoli, 2010).

1.1.3.1. Transport vers le cerveau

Ainsi, les différents isomères d'AR (tout-*trans*, 9-*cis*, 13-*cis*) dont la concentration plasmatique a été estimée de l'ordre du nM par la technique de CL-SM/SM, peuvent être véhiculés jusqu'au cerveau. Il a été montré que lorsque le statut en vitamine A est normal, environ 90% de l'AR total du cerveau provient de ce "pool plasmatique" circulant et n'est donc pas synthétisé localement (Kurlandsky et al., 1995). D'autre part, l'isomère tout-*trans* serait le plus transporté au niveau du cerveau (Le Doze et al., 2000) même si les concentrations en tout-*trans* et 13-*cis* semblent très similaires dans le plasma (Fex et al., 1996). Enfin, une étude sur des rats carencés traités en intra-jugulaire par des doses physiologiques d'AR rapporte des niveaux importants d'AR dans le cortex et l'hippocampe (Werner and Deluca, 2002). L'origine de l'AR dans le cerveau semble donc largement exogène lorsque le statut vitaminique A est normal.

1.1.3.2. Métabolisme cérébral

Bien que, comme nous venons de le voir précédemment l'AR présent au niveau cérébral est pour une grande partie issue de la périphérie, le cerveau adulte possède toute la machinerie cellulaire à la synthèse de l'AR, son transport et son action nucléaire (Lane and Bailey, 2005). La présence d'AR dans le système nerveux central résulterait donc à la fois de l'AR circulant mais également de la synthèse endogène à partir du rétinol. Le striatum serait la structure la plus riche en AR tout-*trans* dont la concentration s'élève autour de 78pmol/g alors que dans l'hippocampe cette concentration serait un peu plus faible autour de 45pmol/g (*Tableau 1*). Ainsi, plusieurs études font état de la présence des protéines de transport CRBP et CRABP (Zetterstrom et al., 1994; Zetterstrom et al., 1999), des enzymes de conversion ADH1, ADH4 (Martinez et al., 2001) et RALDH (McCaffery and Drager, 1994; Goodman et

al., 2012) dans plusieurs structures cérébrales. Cependant, il semblerait que l'AR présent dans l'hippocampe soit synthétisé au niveau des méninges adjacentes grâce aux RALDH1 et RALDH2 puis migrerait de manière différentielle vers les différentes régions de l'hippocampe (Goodman et al., 2012). Par ailleurs, du rétinol et des rétinyls esters, précurseurs de l'acide rétinoïque ont également été mis en évidence dans l'hippocampe (Connor and Sidell, 1997).

D'autre part, il semblerait que les astrocytes soient capables de réguler les niveaux d'AR dans le cerveau via les RALDH en particulier lors de situations de déficit en vitamine A. Ainsi, lors d'une carence en vitamine A, la protéine RALDH2 serait capable de transloquer vers le noyau afin de synthétiser directement l'AR au niveau de ses récepteurs nucléaires (Shearer et al., 2012).

Tableau 1 : Concentrations en acide rétinoïque, rétinol, rétinol et rétinyl ester dans différents organes et structures cérébrales.

Source : Kane and Napoli, (2010)

Tissue	atRA (pmol/g)	Total retinal (pmol/g)	Total retinol (nmol/g)	Total RE (nmol/g)
Serum ^b	2.7 ± 0.3 (21)	32.2 ± 6.2 (6)	0.81 ± 0.04 (70)	0.22 ± 0.02 (69)
Liver ^b	38.1 ± 3.4 (18)	160.9 ± 14.3 (26)	9.6 ± 0.9 (60)	562.6 ± 75.9 (55)
Kidney ^b	15.2 ± 2.2 (30)	187.3 ± 31.2 (12)	0.60 ± 0.04 (37)	1.8 ± 0.2 (37)
Adipose ^b (epididymal)	14.2 ± 2.4 (18)	63.5 ± 5.2 (12)	0.63 ± 0.03 (37)	0.59 ± 0.09 (29)
Muscle ^b	1.5 ± 0.2 (15)	–	0.15 ± 0.02 (38)	0.25 ± 0.03 (31)
Spleen ^b	7.3 ± 0.6 (14)	–	0.60 ± 0.06 (26)	1.2 ± 0.1 (26)
Testis ^b	8.9 ± 1.0 (14)	90.7 ± 10.1 (12)	0.08 ± 0.01 (27)	0.31 ± 0.02 (27)
Brain ^b	17.1 ± 3.7 (19)	–	0.32 ± 0.01 (5)	0.22 ± 0.02 (5)
Brain ^c	33.9 ± 3.9 (8)	–	0.68 ± 0.23 (19)	0.84 ± 0.16 (19)
Hippocampus ^c	45.3 ± 5.2 (8)	–	0.30 ± 0.03 (27)	0.70 ± 0.05 (27)
Cortex ^c	16.0 ± 1.3 (7)	–	0.08 ± 0.01 (18)	0.35 ± 0.04 (18)
Olfactory bulb ^c	76.5 ± 21.3 (4)	–	0.20 ± 0.02 (4)	0.63 ± 0.03 (4)
Thalamus ^c	80.9 ± 6.0 (4)	–	0.20 ± 0.04 (4)	0.47 ± 0.06 (4)
Cerebellum ^c	54.8 ± 3.6 (8)	–	0.42 ± 0.08 (8)	0.73 ± 0.10 (8)
Striatum ^c	78.0 ± 33.2 (3)	–	0.21 ± 0.05 (4)	0.41 ± 0.08 (4)

^aOnly a partial list of recovered in vivo retinoid levels. For a full description see Kane et al. (49–51)

^bData were obtained from 2- to 4-month-old male SV129 mice fed and bred from dams fed an AIN93G diet with 4 IU vitamin A/g

^cData were obtained from 4-month-old male C57BL/6 mice fed an AIN93M with 4 IU vitamin A/g from weaning and bred from dams fed a stock diet (>30 IU vitamin A/g). Values are means ± SEM (*n*). Serum values are either pmol/ml or nmol/ml.

–, not measured

I.2. Les glucocorticoïdes

Les glucocorticoïdes (GC) sont des hormones stéroïdiennes essentielles pour la vie. Elles jouent un rôle important au cours du développement en tant que régulateur de la différenciation tissulaire, mais également chez l'adulte, où elles vont être notamment impliquées dans le contrôle et la coordination des processus physiologiques de réponse au stress (Rousseau, 1984b, a).

I.2.1. Biosynthèse et métabolisme des glucocorticoïdes

I.2.1.1. Biosynthèse des glucocorticoïdes

La biosynthèse des glucocorticoïdes a lieu dans les glandes surrénales et plus précisément dans la zone fasciculée du cortex surrénalien (*Figure 4*). La fixation de l'ACTH (Adrenocorticotrophin hormone) sur ses récepteurs ACTHR entraîne une cascade de réactions aboutissant à la synthèse de cortisol (chez l'homme) ou corticostérone (chez le rongeur et les oiseaux) (*Figure 5*). En effet, les ACTHR sont des récepteurs membranaires couplés aux protéines G (RCPG). Lorsque l'ACTH se lie au récepteur, la voie de signalisation de l'AMPc s'active et entraîne l'expression de gènes codant pour les enzymes impliquées dans la synthèse des glucocorticoïdes. Cette biosynthèse se fait à partir du cholestérol issu de la synthèse hépatique ou de l'absorption intestinale. Une autre classe d'hormones stéroïdiennes est synthétisée dans la zone glomérulée du cortex surrénalien : les minéralocorticoïdes. Ils sont 100 fois moins abondants que les glucocorticoïdes et leur principal représentant est l'aldostérone. Comme tous les stéroïdes, les glucocorticoïdes sont lipophiles. Cette propriété leur confère la capacité de traverser la bicouche lipidique des cellules. Ainsi, ils ne sont pas stockés dans la cellule mais sont immédiatement libérés dans la circulation sanguine après leur synthèse. Par ailleurs, ils ne sont pas bloqués par la barrière hématoencéphalique et entrent ainsi facilement dans le cerveau, sous leur forme libre.

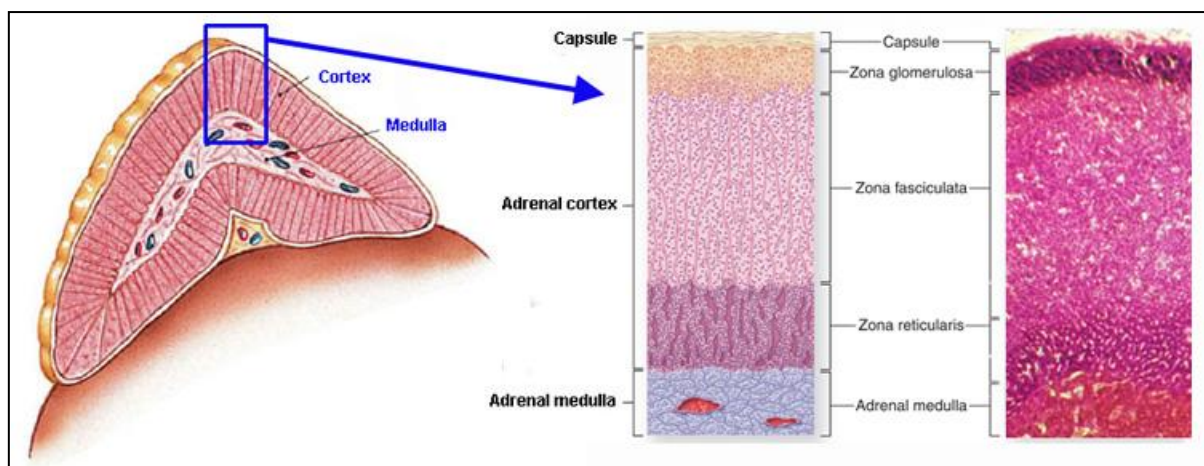


Figure 4 : Anatomie de la glande surrénale.

Source : www.endocrinesurgery.net.au

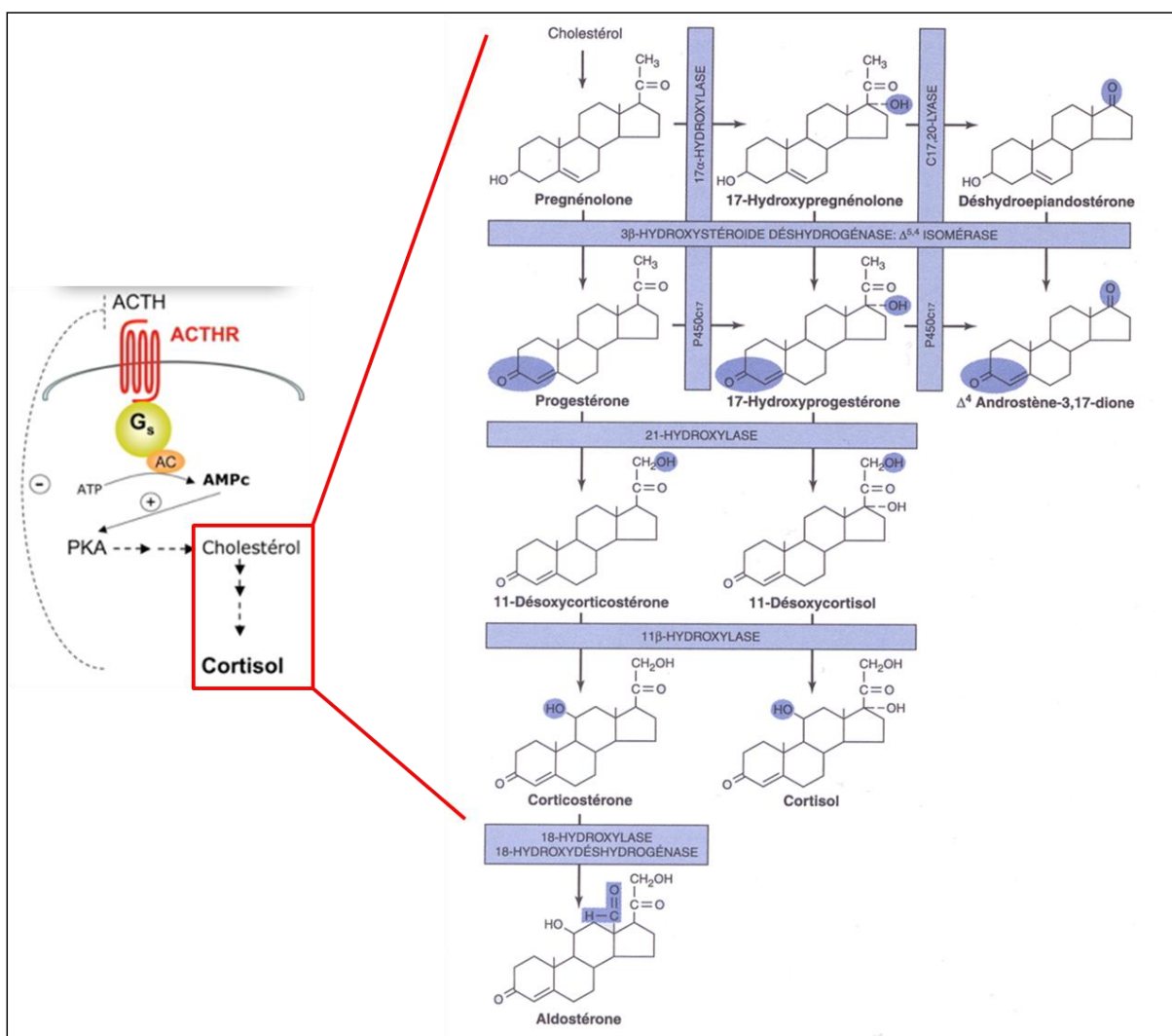


Figure 5 : Biosynthèse des glucocorticoïdes.

Sources : « Biochimie de Harper », 25^{ème} édition, de Boeck Université ; <http://www-dsv.cea.fr>

I.2.1.2. Métabolisme des glucocorticoïdes

Comme nous venons de le voir précédemment, la biosynthèse des glucocorticoïdes implique plusieurs étapes de métabolisation. La dernière étape consistant à convertir la forme inactive de l'hormone également appelée 11-désoxycorticostérone (ou 11-désoxycortisol) en sa forme active la corticostérone (ou le cortisol) met en jeu la participation de l'enzyme 11 beta-hydroxystéroïde déshydrogénase de type 1 (11β -HSD1) : une réductase NADPH-dépendante. La réaction inverse permettant l'inactivation de l'hormone est également possible et dépend d'une autre enzyme : la 11 beta-hydroxystéroïde déshydrogénase de type 2 (11β -HSD2) : une déshydrogénase NAD-dépendante (Figure 6). Ainsi, les concentrations intracellulaires en GC actifs et inactifs sont directement sous le contrôle de l'activité de ces deux enzymes.

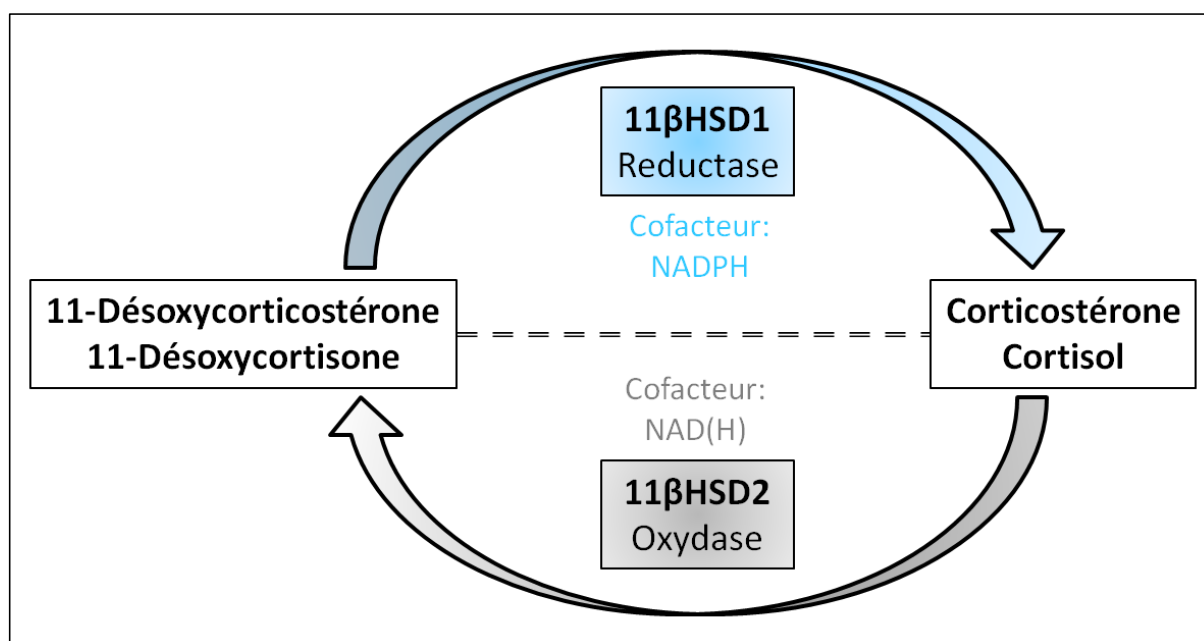


Figure 6 : Métabolisme intracellulaire des glucocorticoïdes.

L'enzyme 11β -HSD1 prédomine dans de nombreux tissus cibles des glucocorticoïdes tels que le foie, le tissu adipeux, les muscles, les poumons, les gonades, les os, les yeux, la peau, le muscle lisse vasculaire et le système nerveux central. Son activité et son expression sont particulièrement étudiées au niveau des structures impliquées dans les processus mnésiques tels que l'hippocampe et le cortex.

Son isoforme, la 11β -HSD2, est quant à elle, plutôt concentrée dans des tissus cibles de l'aldostérone tels que les glandes salivaires, les glandes sudoripares, les reins et le côlon.

On ne la trouve pas dans des structures cérébrales telles que l'hippocampe. Dans les reins et dans le côlon, les récepteurs aux minéralocorticoïdes (MR) ont la même affinité pour le cortisol que l'aldostérone. Ainsi, dans ce cas bien précis, le rôle de la 11 β -HSD2 sera d'inactiver le cortisol afin de protéger les MR d'une activation inappropriée (Edwards et al., 1988). Dans le fœtus, son rôle va être d'inactiver le cortisol maternel, afin de limiter son exposition aux GCs (Seckl, 1997; Seckl and Walker, 2001; Wyrwoll et al., 2011; Lavery et al., 2012; Yau and Seckl, 2012).

La demi-vie plasmatique du cortisol, chez l'Homme, est de 60 à 90min : celle de la corticostérone, chez le rongeur, est un peu plus courte et dure environ 50min. La demi-vie biologique, correspondant au temps nécessaire pour perdre la moitié de ces effets biologiques, est elle de l'ordre de 8 à 12h. La majorité des glucocorticoïdes est réduite et conjuguée dans les cellules cibles et le foie. Ces hormones sont ensuite excrétées puis éliminées dans les urines sous forme dégradée en glucoronides, ou sous forme non dégradé (forme libre).

1.2.2. L'axe corticotrope

L'axe corticotrope ou axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HPA pour Hypothalamic-Pituitary-Adrenal axis) constitue un système fondamental impliqué dans la réponse adaptative au stress chez les mammifères. C'est un système neuroendocrinien composé de 3 structures principales interagissant entre elles : l'hypothalamus, l'hypophyse (ou antéhypophyse) et les glandes surrénales. Lors d'un stress, la stimulation de l'axe corticotrope aboutit à la production et la libération dans le sang des hormones glucocorticoïdes. Ces dernières vont alors d'une part agir dans les tissus cibles engendrant ainsi la plupart des effets physiologiques connus et d'autre part, elles vont réguler leur propre sécrétion en exerçant une boucle de rétroaction négative (ou rétrocontrôle négatif) au niveau des différentes structures composant l'axe HPA.

1.2.2.1. Stimulation et libération des glucocorticoïdes

Les centres supérieurs et en particulier le système limbique, composé du septum, du fornix, de l'hippocampe, de l'amygdale ou encore des cortex insulaire et fronto-orbitaire postérieur sont les intégrateurs des processus cognitifs tels que la mémoire et les émotions. Lors d'un stress, l'activation de ces structures présentant des projections excitatrices sur le noyau paraventriculaire (PVN) de l'hypothalamus (Gray et al., 1989) va entraîner la libération

d'arginine vasopressine (AVP) et de corticolibérine ou CRH (Corticotropin releasing hormone). L'AVP est un peptide de 9 acides aminés synthétisé dans les neurones magnocellulaires des noyaux paraventriculaires et supraoptiques hypothalamiques et le CRH un peptide de 41 acides aminés synthétisé dans les neurones parvocellulaires du PVN. Les terminaisons axonales de ces neurones sont très proches des capillaires sanguins irriguant l'hypophyse, favorisant ainsi une action très rapide.

La régulation de la libération de CRH est un processus clé dans le bon fonctionnement de l'axe corticotrope. En effet, il a été montré qu'une libération chronique de CRH était capable d'entraîner une hyperactivité de l'axe HPA, ayant des conséquences néfastes sur la régulation de l'expression génique en particulier au niveau de l'hippocampe et du PVN de hypothalamus (Flandreau et al., 2012).

La fixation de l'AVP et/ou du CRH sur leurs récepteurs membranaires respectifs VR et CRHR (des RCPG) au niveau de l'hypophyse entraîne, via une cascade moléculaire, la transcription du gène codant pour la proopiomélanocortine (POMC) (Dinan and Scott, 2005). POMC est un peptide de 241 acides aminés, précurseur de plusieurs hormones polypeptidiques (Mains et al., 1977) dont l'hormone adrénocorticotrope ou ACTH.

L'ACTH est sécrétée et libérée dans la circulation sanguine et vient se fixer sur ses récepteurs ATCHR au niveau des cellules du cortex surrénalien de la glande surrénale afin d'activer la synthèse des glucocorticoïdes. Au niveau hypothalamique, l'ACTH exerce un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion de CRH et donc sur sa propre sécrétion (Aguilera, 1994).

La régulation de la libération d'ACTH apparaît comme tout aussi importante que celle du CRH, car il a été montré qu'une libération chronique d'ACTH était capable d'augmenter la taille de la masse corticale des surrénales et également la capacité de synthèse et de sécrétion des glucocorticoïdes (Slavinski et al., 1976).

1.2.2.2. Transport vers le cerveau

Les glucocorticoïdes sont libérés dans le plasma au niveau des surrénales. Dans la circulation sanguine, ils circulent principalement sous 2 formes : la forme libre et la forme liée.

La forme libre représente environ 5 à 10% de l'hormone totale circulante à l'état basal (Hammond et al., 1980). Elle constitue le "pool actif" de l'hormone (Mendel, 1989) c'est-à-dire la fraction capable d'aller agir directement au niveau des récepteurs aux glucocorticoïdes

(GR : Glucocorticoid receptor) et aux minéralocorticoïdes (MR : Mineralocorticoid receptor) dans les tissus cibles (de Kloet et al., 2008). Sous cette forme, les glucocorticoïdes régulent leur propre sécrétion par rétrocontrôle négatif.

La forme liée représente environ 90 à 95% de l'hormone totale circulante. Elle constitue le "pool inactif" de l'hormone c'est-à-dire la réserve plasmatique et biodisponible des glucocorticoïdes. Les glucocorticoïdes se lient avec une forte affinité mais une faible capacité à la transcortine également appelé CBG (CorticosteroidBinding Globulin). Ce complexe CBG-corticostérone représente environ 85% de la fraction liée. La CBG est une glycoprotéine plasmatique synthétisée par les cellules du foie (hépatocytes) qui est incapable de passer la barrière hématoencéphalique (Pardridge and Mietus, 1979). Par ailleurs, les glucocorticoïdes peuvent également se lier de manière aspécifique mais avec une forte capacité à l'albumine. La proportion de glucocorticoïdes liée à l'albumine représente environ 15% de la fraction liée (Dunn et al., 1981; Siiteri et al., 1982; Breuner and Orchinik, 2002). L'albumine est une protéine hydrosoluble synthétisée par le foie et présente en grande quantité dans le plasma. Les glucocorticoïdes aspécifiquement liés à l'albumine sont capables de passer la barrière hématoencéphalique.

Dans le plasma circule également une autre forme inactive des glucocorticoïdes : la 11-désoxycorticostérone (ou 11-désoxycortisol), le précurseur de la corticostérone (ou cortisol). Sous cette forme libre, ils sont capables de passer la barrière hématoencéphalique et ainsi d'entrer dans les tissus cibles cérébraux.

En résumé, la concentration intracellulaire en glucocorticoïdes va être dépendante à la fois de la quantité de corticostérone libre dans le plasma, mais également de la conversion intracellulaire des glucocorticoïdes inactifs vers leur forme active via la 11 β -HSD1 (Yau and Seckl, 2012) (*Figure 7*).

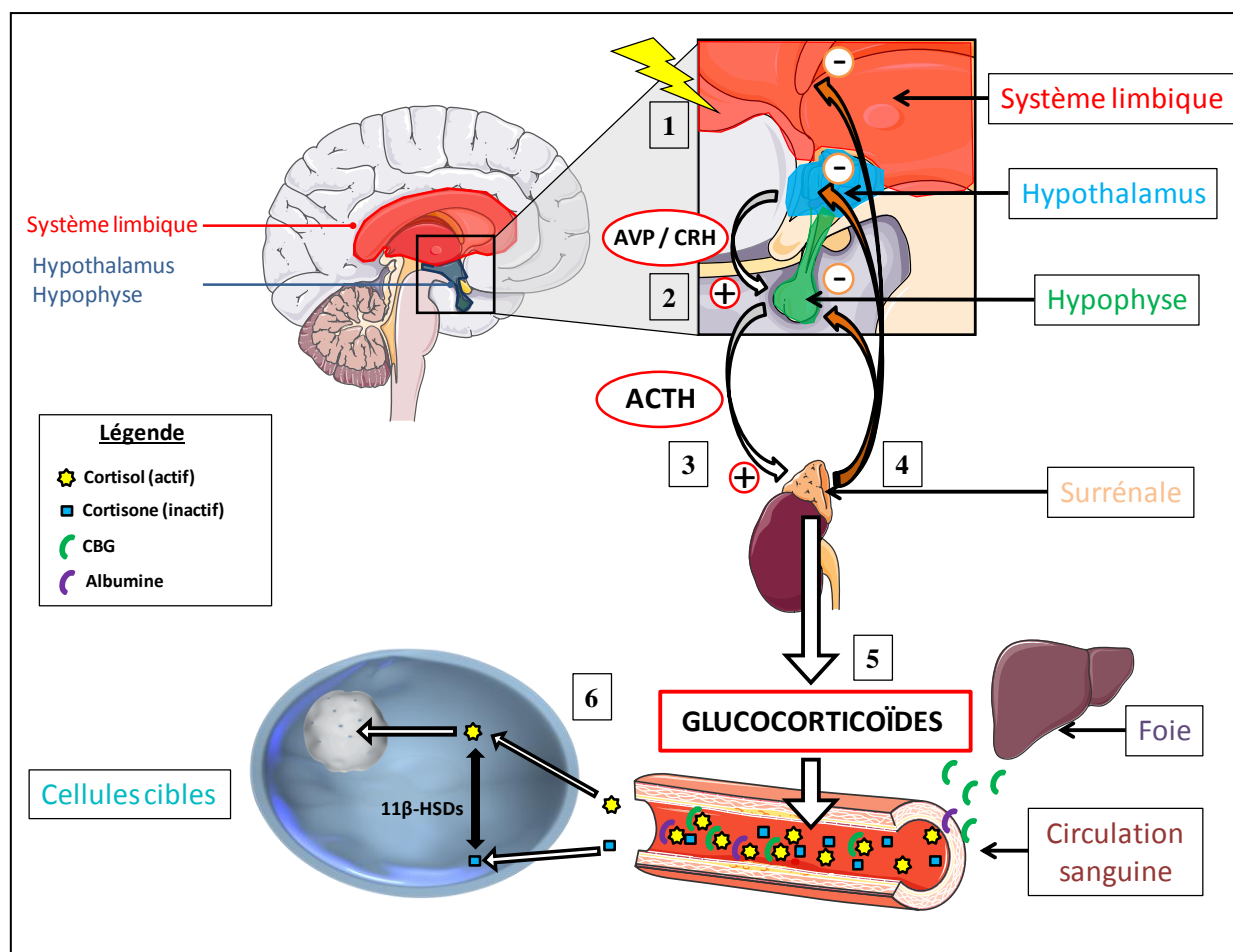


Figure 7 : Axe HPA et glucocorticoïdes.

1. L'activation des centres supérieurs et notamment du système limbique stimule l'hypothalamus. 2. Libération d'AVP et de CRH par l'hypothalamus qui vont stimuler l'hypophyse. 3. Libération d'ACTH par l'hypophyse qui va stimuler la production de cortisone et de cortisol au niveau des surrénales. 4. Rétrocontrôle négatif des glucocorticoïdes au niveau des structures de l'axe HPA. 5. Libération dans la circulation sanguine de cortisol et de cortisone libre mais également de cortisol lié à la CBG ou à l'albumine. 6. Pénétration dans les cellules cibles, le cortisol viendra se fixer directement sur les récepteurs nucléaires (GR ou MR) tandis que la cortisone sera métabolisée par l'enzyme 11β -HSD1 en cortisol avant de venir se fixer sur ses récepteurs.

1.2.2.3. Régulation des niveaux plasmatiques des glucocorticoïdes

Les glucocorticoïdes sont capables de réguler leur propre sécrétion en exerçant un rétrocontrôle négatif sur les structures composantes de l'axe HPA (hypothalamus, hypophyse) mais également sur les structures limbiques possédant des récepteurs aux glucocorticoïdes. Ce rétrocontrôle négatif a pour but de limiter la libération de l'hormone dans le sang et ainsi limiter la durée d'exposition des tissus cibles aux glucocorticoïdes, délétère à long terme pour de nombreuses fonctions physiologiques (Aisa et al., 2007; Conrad et al., 2007; de Quervain et al., 2009; Flandreau et al., 2012). Les glucocorticoïdes agissent sur le PVN de

l'hypothalamus et sur l'hypophyse antérieure via leurs récepteurs, inhibant ainsi la transcription des gènes conduisant à la synthèse et la sécrétion de la CRH et de l'ACTH. Certaines structures du système limbique (hippocampe, cortex préfrontal, amygdale) possédant des récepteurs aux glucocorticoïdes sont également fortement impliquées dans la régulation inhibitrice de l'axe HPA. Il a été montré notamment que les neurones hippocampiques activent un réseau GABAergique capable d'inhiber les neurones du PVN (Jacobson and Sapolsky, 1991; Herman et al., 2003; Cullinan et al., 2008).

Résumé

Dans ce chapitre, nous nous sommes attachés à décrire les voies de biosynthèse ainsi que le métabolisme de l'acide rétinolique et des glucocorticoïdes. Il en ressort que même si ces voies présentent des divergences dans leurs processus de biosynthèse et de métabolisme, elles aboutissent de manière analogue à la production finale d'un composé hormonal libéré dans la circulation sanguine. Ces hormones, par définition, vont être capables d'agir au niveau des cellules cibles par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques, et ce, dans le but d'influencer leur homéostasie.

CHAPITRE II. MODE D'ACTION DE L'ACIDE RÉTINOÏQUE ET DES GLUCOCORTICOÏDES

Le mode d'action des rétinoïdes et des glucocorticoïdes est très similaire, il correspond à une action hormonale. Les hormones lipophiles (ou hydrophobes), capables de traverser la bicouche lipidique des cellules, vont agir directement au niveau du noyau cellulaire en se liant sur des récepteurs nucléaires. A titre d'exemple, on retrouve dans cette catégorie les hormones stéroïdiennes (glucocorticoïdes, minéralocorticoïdes, œstrogènes, etc.), les rétinoïdes, les hormones thyroïdiennes...

II.1. La superfamille des récepteurs nucléaires

II.1.1. Généralités

Il est maintenant bien établi que les hormones stéroïdiennes et les rétinoïdes entre autres, agissent dans les cellules cibles principalement par l'intermédiaire de récepteurs nucléaires dans le but de réguler la transcription d'un certain nombre de gènes cibles. La caractérisation de ces récepteurs nucléaires, dont les premiers clonés furent le récepteur des glucocorticoïdes (GR) (Hollenberg et al., 1985) et le récepteur des œstrogènes (ER) (Green et al., 1986b; Green et al., 1986a), a permis de montrer la forte homologie de structure entre ces protéines et de les regrouper en une superfamille de récepteurs nucléaires (Novac and Heinzl, 2004; Huang et al., 2010).

Ces récepteurs nucléaires peuvent être regroupés en 4 sous-familles, en fonction de plusieurs critères tels que leur ligand, leur propriété de liaison à l'ADN ou encore leur propriété de dimérisation (*Figure 8*) :

- Les récepteurs des stéroïdes : glucocorticoïdes (GR), minéralocorticoïdes (MR), œstrogènes (ER)...
- Les récepteurs des hormones thyroïdiennes (TR), des rétinoïdes (RAR) ou de certains acides gras polyinsaturés et eicosanoïdes (PPAR) formant des hétérodimères avec les RXRs.
- Les récepteurs homodimériques orphelins.
- Les récepteurs monomériques orphelins.

Par ailleurs, certains récepteurs de la superfamille n'ont encore pas à ce jour de ligand connu, c'est la raison pour laquelle ils ont été regroupés sous le terme de récepteurs orphelins et appartiennent en général aux deux dernières sous-familles (Enmark and Gustafsson, 1996).

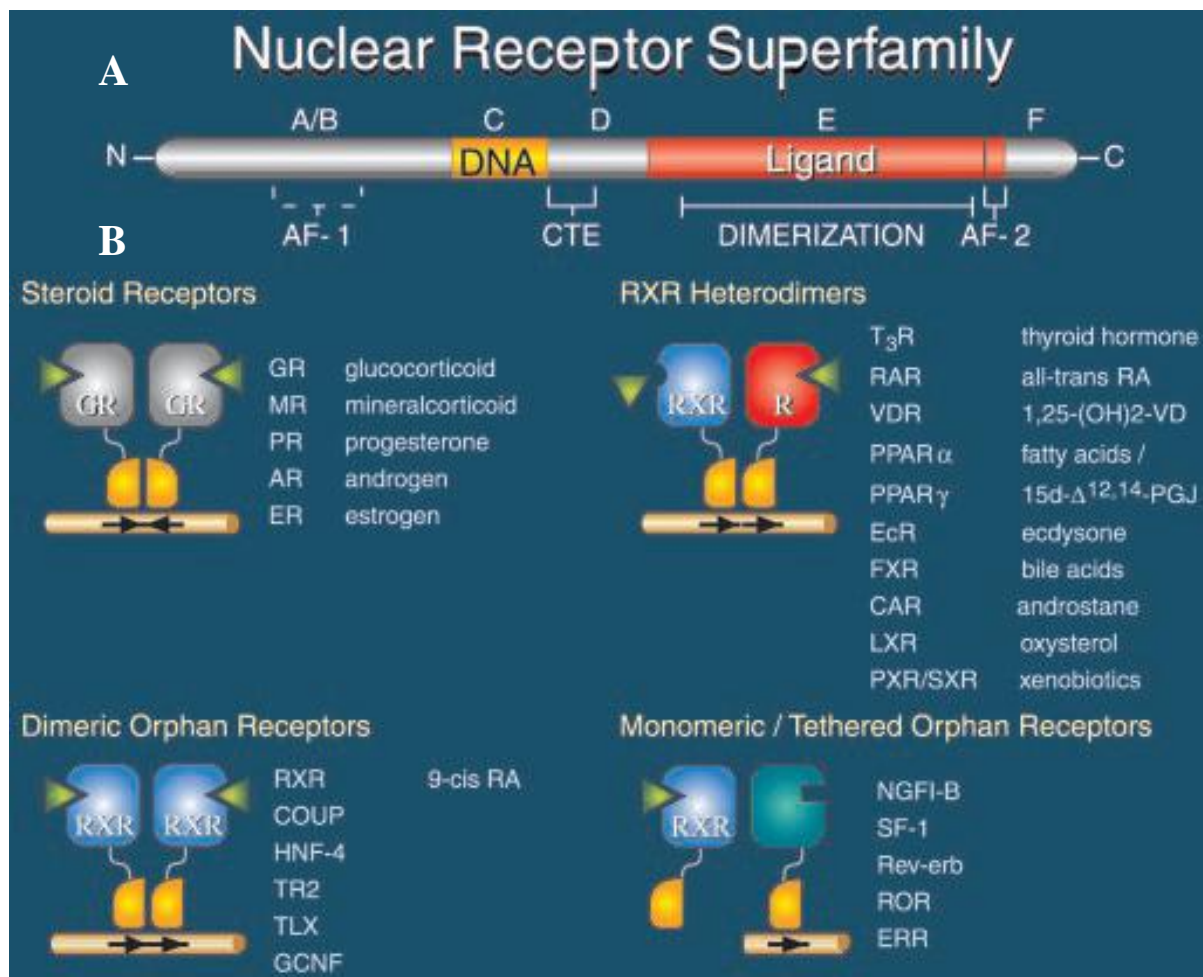


Figure 8 : Structure et classification de la superfamille des récepteurs nucléaires.

Source : Olefsky, (2001)

A : Représentation schématique des différents domaines fonctionnels. AF : région portant la fonction de l'activation dépendante ou non de la présence du ligand; CTE : constitutive transport element. DBD : domaine de liaison à l'ADN (DNA Binding Domain); LBD : domaine de liaison au ligand (Ligand Binding Domain).

B : Classification des récepteurs nucléaires. AR : récepteur des androgènes ; ER : récepteur des œstrogènes; GR : récepteur des glucocorticoïdes; MR : récepteur des minéralocorticoïdes; PR : récepteur de la progestérone; RAR : récepteur de l'acide rétinoïque tout-trans; RXR : récepteur de l'acide 9-cis rétinoïque; TR : récepteur de la triiodothyronine; PPAR : récepteur des activateurs de prolifération péroxysomale; EcR : récepteur de l'ecdysone; FXR : récepteur des acides biliaries; CAR : récepteur de l'androstane; LXR : récepteur de l'oxystérol; PXR/SXR : récepteur de xénobiotiques; VDR : récepteur de la vitamine D₃; divers récepteurs orphelins dont ERR : récepteur apparenté au récepteur de l'œstrogène; HNF4 : facteur nucléaire mis en évidence dans l'hépatocyte; TR2 : récepteur testiculaire.

II.1.2. Structure générale des récepteurs nucléaires

Les récepteurs nucléaires présentent une forte homologie dans leur structure protéique, avec quatre domaines principaux possédant divers degrés de conservation entre les différents membres de la superfamille (*figures 8.A et 9*) (Chambon, 2005; Germain et al., 2006a):

- Le domaine A/B: impliqué dans la transactivation de manière indépendante du ligand (AF-1), est faiblement conservé et correspond à l'extrémité N-terminale (-NH₂) de la protéine codée (Nagpal et al., 1992).

- Le domaine C: correspond au domaine de liaison à l'ADN (aussi appelé DBD pour DNA binding domain), montre un fort degré d'homologie entre les différents membres de la super famille. Deux motifs en doigt de zinc jouent un rôle complémentaire dans la liaison spécifique aux éléments de réponse situés dans le promoteur des gènes cibles. Ce domaine participe également à la dimérisation des récepteurs (Khorasanizadeh and Rastinejad, 2001; Rastinejad, 2001).

- Le domaine D: est une région charnière entre les domaines C et E et permet la réalisation de différentes configurations fonctionnelles. Il pourrait être impliqué dans la localisation nucléaire des récepteurs (Germain et al., 2006a).

- Le domaine E: correspond au domaine de liaison au ligand (aussi appelé LBD pour ligand binding domain), possède une structure complexe et longue en acides aminés. Il est le site où les ligands se fixent et où les complexes de coactivateurs interagissent (Greschik et al., 2002). Dans certains cas, le LBD peut aussi constituer une surface de dimérisation (Moras and Gronemeyer, 1998; Bourguet et al., 2000). Enfin dans la plupart des LBD, se trouve la fonction AF-2 qui joue un rôle dans la régulation de la transcription dépendante du ligand et qui constitue une région d'interaction pour les protéines de chocs thermiques Hsp (Heat shock protein).

- Le domaine F: certains membres de la superfamille (RAR, ER, TR) possèdent ce domaine C-terminal dont la taille est variable et dont la fonction reste encore inconnue (O'Malley, 1990).

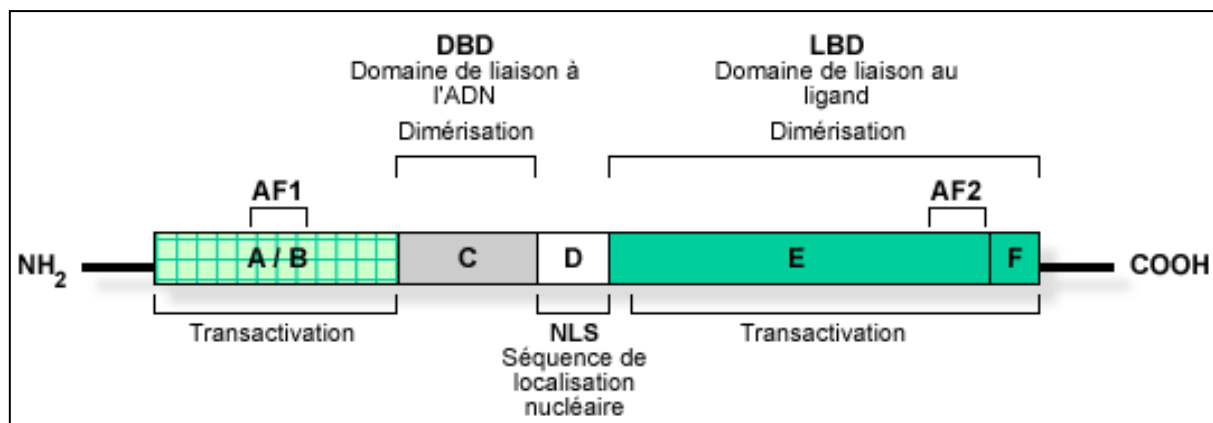


Figure 9 : Architecture des récepteurs nucléaires.

Source : D'après Aranda and Pascual, (2001)

II.1.3. Les différents types de récepteurs nucléaires des rétinoïdes

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

Il existe deux familles multigéniques qui codent pour les récepteurs nucléaires des rétinoïdes (Bastien and Rochette-Egly, 2004). La première de ces familles comprend des récepteurs de type RAR (Retinoic Acid Receptor) qui présentent une affinité élevée pour l'acide tout-*trans* rétinoïque ($K_d=10\text{nM}$) et moins élevée pour l'acide 9-*cis* rétinoïque (Yang et al., 1991). La seconde famille code pour des récepteurs de type RXR (Retinoid X Receptor) qui présentent une affinité élevée pour l'acide 9-*cis* rétinoïque ($K_d=1-5\text{nM}$) et plus faible pour l'acide tout-*trans* rétinoïque (Chambon, 1996).

La masse moléculaire de ces récepteurs est d'environ 50kDa. Pour chacun de ces récepteurs, trois types de protéines ont été isolés, codés par trois gènes distincts: RAR α , β , γ et RXR α , β , γ (Chambon, 1996). Les séquences d'acides aminés de ces trois formes sont très similaires dans les domaines B, C, D et E mais diffèrent dans les domaines A et F. Seul le domaine C de liaison à l'ADN est très conservé entre les différentes classes de RAR et RXR

(Figure 10). Chaque gène peut coder pour plusieurs isoformes essentiellement différentes au niveau de l'extrémité aminoterminal, suite à l'utilisation de deux promoteurs alternatifs ou résultant de l'épissage alternatif (Giguère, 1994 ; revue dans Chambon, 1996).

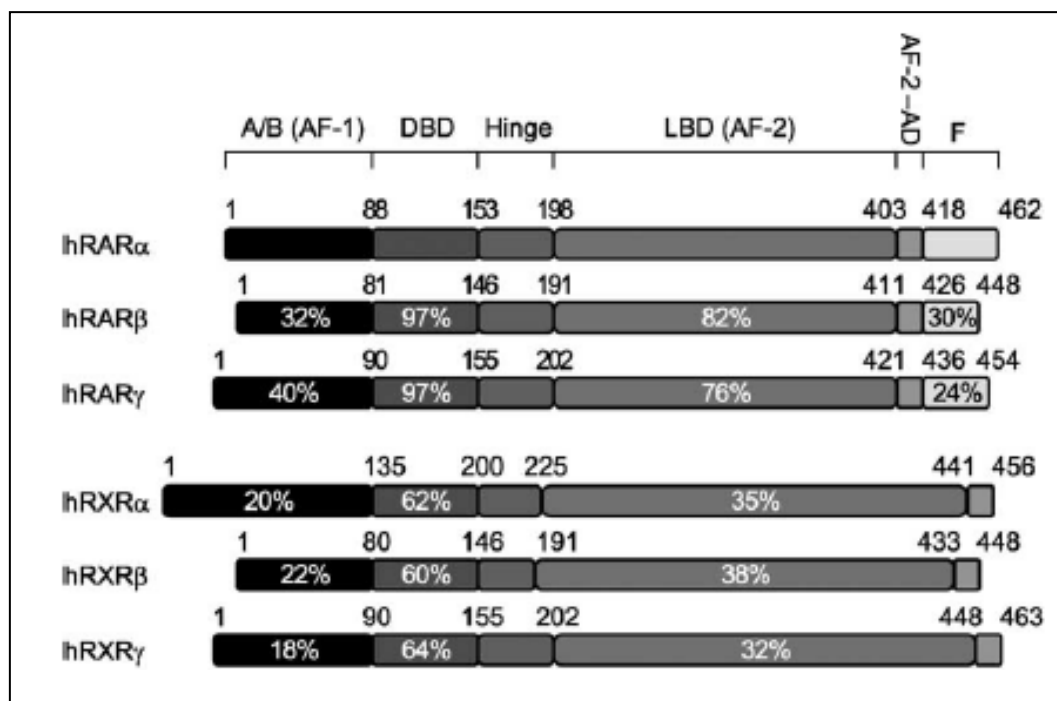


Figure 10 : Homologie de structure des RAR et RXR chez l'homme.

Source : Lefebvre, (2005)

II.1.4. Les différents types de récepteurs nucléaires des glucocorticoïdes

De la même manière que les récepteurs aux rétinoïdes, les récepteurs aux glucocorticoïdes agissent en tant que facteur de transcription pour réguler l'expression génique au sein de la cellule. La compréhension de leur(s) rôle(s) dans les processus de signalisation cellulaire est donc tout aussi importante.

Il existe deux types de récepteur aux glucocorticoïdes : le récepteur aux minéralocorticoïdes (MR ou de type 1) et le récepteur aux glucocorticoïdes (GR ou type 2) (de Kloet et al., 1990). Ils ont été mis en évidence respectivement en 1987 et 1985. Les deux récepteurs sont capables de lier le cortisol (ou corticostérone), en revanche les MR ont 6 à 10 fois plus d'affinité pour lui ($K_d=0,5nM$) que les GR ($K_d=2,5-5nM$). Il est important de noter que les GR sont plus spécifiques du cortisol que les MR car ils sont très peu affins pour

l'aldostérone ($K_d=20\text{nM}$) contrairement aux MR. Par ailleurs, les GR présentent une très forte affinité pour les glucocorticoïdes de synthèse tels que la dexaméthasone ($K_d=0,5\text{nM}$).

Les glucocorticoïdes sont donc préférentiellement liés aux MR ce qui a pour conséquence de les saturer en quasi-totalité dans des conditions basales. En revanche, les GR, moins liés aux glucocorticoïdes en conditions basales, vont progressivement être occupés lors d'une hypersécrétion de glucocorticoïdes notamment lors d'un stress (Reul et al., 1987b, a).

II.1.5. Les éléments de réponse

La forte homologie structurelle entre les différents récepteurs se retrouve également dans leur mode de fonctionnement (Bastien and Rochette-Egly, 2004). La liaison au récepteur entraîne sa fixation au niveau de séquences spécifiques de l'ADN appelées éléments de réponse aux hormones (HRE pour Hormone Response Element). Les HRE sont situés en amont du gène cible et il en existe plusieurs types en fonction du récepteur responsable de l'activation de la transcription. A titre d'exemple, les récepteurs à l'acide rétinoïque (RAR) se fixent au niveau des RARE (Retinoic Acide Response Element) alors que les récepteurs aux glucocorticoïdes se fixent au niveau des GRE (Glucocorticoid Response Element). Il est à noter que les glucocorticoïdes peuvent également se lier sur des domaines nGRE (negative Glucocorticoid Response Element) qui vont, non pas activer, mais au contraire, réprimer la transcription du gène en aval.

La composition structurelle des HRE est généralement basée sur un même principe : deux demi-sites pour la plupart hexanucléotidiques, dérivés d'une séquence consensus qui leur est propre et combinés de manière palindromique ou directement répétés (DR) (mais parfois plus complexe), séparés de 1 à 5 nucléotides ou bien strictement contigus (Umesono et al., 1991). Plusieurs motifs peuvent répondre à un même récepteur nucléaire, mais la liaison sera plus ou moins favorisée et la transcription sera régulée différemment (Evans, 2005).

Les éléments de réponse à l'acide rétinoïque situés dans le promoteur des gènes cibles lient plus facilement les dimères de récepteurs et donnent lieu à une meilleure activité transcriptionnelle avec des hétérodimères, principalement avec les récepteurs nucléaires RXR (Rowe, 1997; Rastinejad, 2001).

II.2. Mode d'action nucléaire de l'acide rétinoïque et des glucocorticoïdes

II.2.1. Mode d'action nucléaire de l'acide rétinoïque

Dans la cellule, l'AR pénètre par diffusion passive à travers la membrane cytoplasmique. Le transport et l'adressage de l'AR jusque dans les récepteurs nucléaires se fait via les protéines de transport CRABP (CRABP I and CRABP II). Ces protéines de transport sont d'importants modulateurs de la biodisponibilité intracellulaire de l'AR (Giguere et al., 1990; Ong, 1994). Seul CRABP-I est exprimé dans l'hippocampe, structure impliquée dans les processus de mémorisation (Goodman et al., 2012). Le rôle précis de ces protéines reste encore à déterminer mais certains travaux suggèrent que CRABP-I limiterait la quantité d'AR libre dans la cellule en jouant un rôle de tampon. Ainsi, il permettrait de réguler la quantité d'AR se fixant sur ses récepteurs nucléaires et par conséquent l'activité de la voie de signalisation (Maden et al., 1988; Perez-Castro et al., 1989). Les récepteurs à l'acide rétinoïque sont directement présents sous forme de dimères (RAR/RXR et RXR/RXR) dans le noyau au niveau de l'ADN. En l'absence de ligand, ils sont inactifs et c'est la liaison de l'AR au récepteur qui entraîne son activation et l'amorçage de la transcription du gène cible (*Figure 11*).

II.2.2. Mode d'action nucléaire des glucocorticoïdes

A l'état de « repos », les récepteurs aux glucocorticoïdes sont présents dans le cytoplasme sous forme de complexe multiprotéique composé du récepteur et de protéines chaperonnes : deux protéines de choc thermique Hsp90 (Heat shock protein), une protéine Hsp70 et une Hsp50 (Zhou and Cidlowski, 2005) (*Figure 12*). Les glucocorticoïdes étant lipophiles, ils diffusent à travers la membrane cellulaire et se lient au niveau des récepteurs du complexe multiprotéique présent dans le cytoplasme. La liaison entraîne un changement conformationnel à l'origine de la dissociation des protéines chaperonnes avec le récepteur. Ceci entraîne le passage actif dans le noyau à l'aide de protéines de translocation nucléaire recrutées par la libération spécifique de signaux après le changement de conformation. Dans le noyau, les récepteurs s'associent entre eux pour former des dimères (exemples : GR/GR,

GR/MR, MR/MR). Ils peuvent alors agir de 3 manières différentes pour induire ou réprimer la transcription du gène cible :

- Interaction directe du récepteur au niveau de son élément de réponse HRE (Hormone Response Element).
- Interaction du récepteur avec d'autres facteurs de transcription (TF) déjà présents sur l'ADN.
- Interaction du récepteur avec l'ADN et d'autres facteurs de transcription.

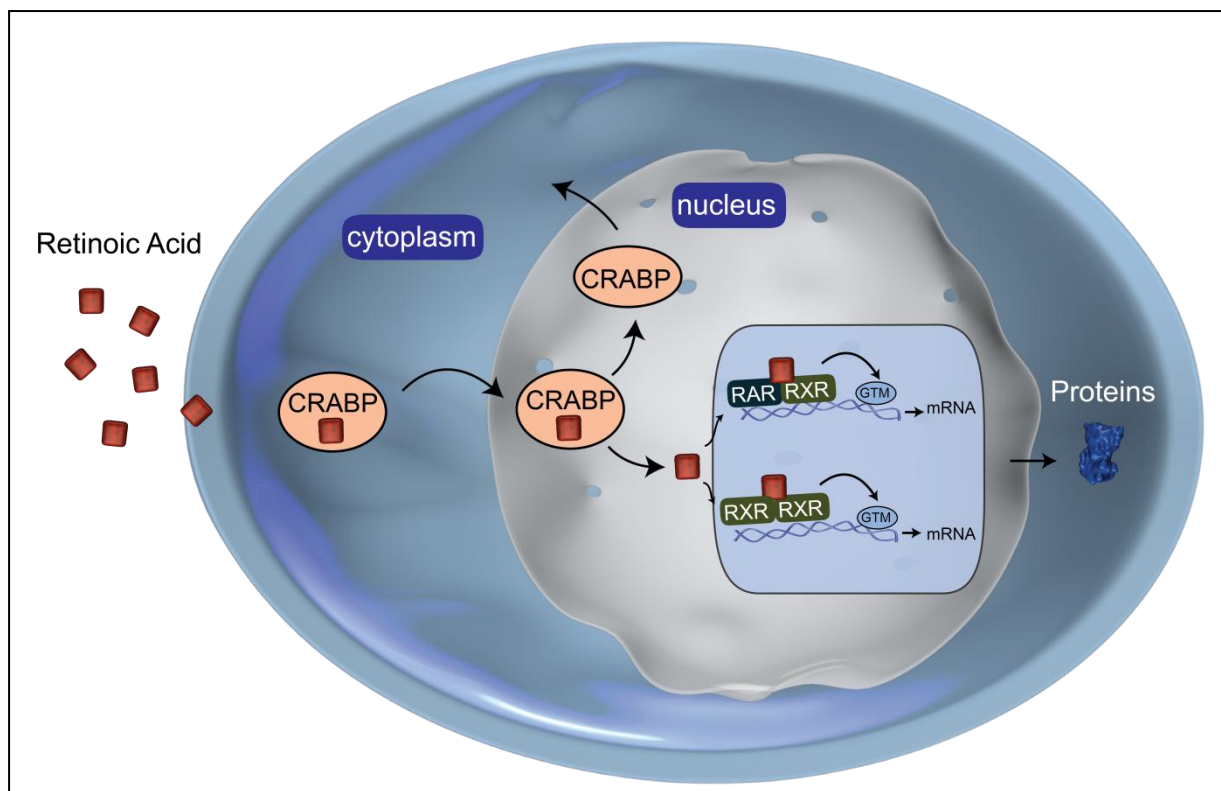


Figure 11 : Mode d'action des rétinoïdes.

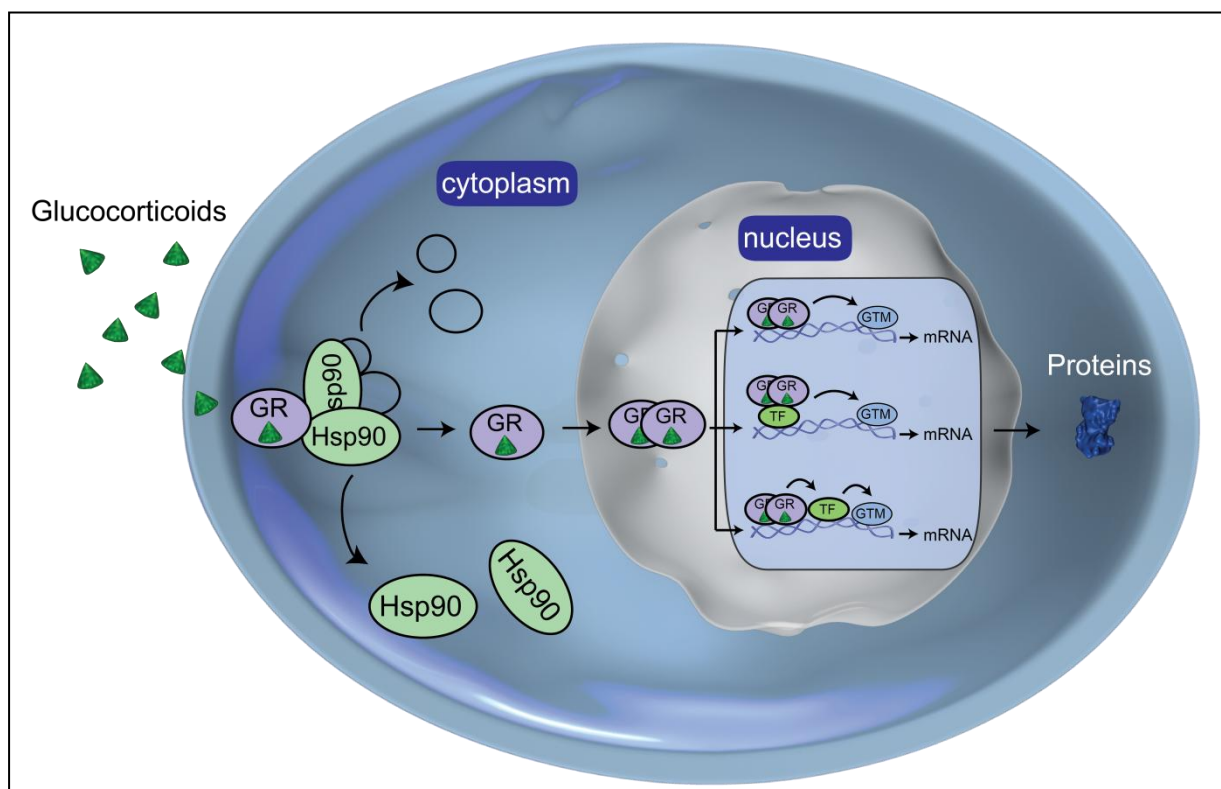


Figure 12 : Mode d'action des glucocorticoïdes.

TF : Transcription Factor ; GTM : General Transcription Machinery

II.3. Régulation de l'activité transcriptionnelle des récepteurs nucléaires

II.3.1. Le rôle des cofacteurs de transcription

Les récepteurs nucléaires sont au centre d'un système complexe de régulation, et la fixation du ligand n'est pas toujours suffisante pour que le récepteur induise l'activation de la transcription d'un gène cible (Germain et al., 2006a). Des protéines appelées cofacteurs de transcription régulent l'activité transcriptionnelle de ces récepteurs, leur permettant soit d'activer (co-activateurs), soit de réprimer (co-répresseurs) l'expression d'un gène (*Figure 13*).

A l'état de repos, lorsque le ligand n'est pas fixé au récepteur nucléaire, ou dans d'autres cas, comme lorsqu'il est lié à un antagoniste, une interaction avec des co-répresseurs va être à l'origine de la répression de la transcription (Germain et al., 2006a). En revanche, à l'état activé, c'est-à-dire lorsque le récepteur nucléaire est lié à son ligand, il va s'opérer un changement de conformation du LBD (Ligand Binding Domain) du récepteur permettant ainsi le recrutement de co-activateurs. Les co-activateurs vont permettre l'activation de la transcription en favorisant le recrutement et/ou l'activation de la machinerie transcriptionnelle. On en dénombre aujourd'hui plus d'une centaine et leur nombre ne cesse d'augmenter depuis leur première découverte (Chen and Evans, 1995; Cosma, 2002; De Bosscher, 2010).

La capacité de ces cofacteurs à interagir avec plusieurs récepteurs leur confère un rôle central dans l'intégration des signaux hormonaux, d'autant plus qu'ils sont présents en quantité limitée dans la cellule.

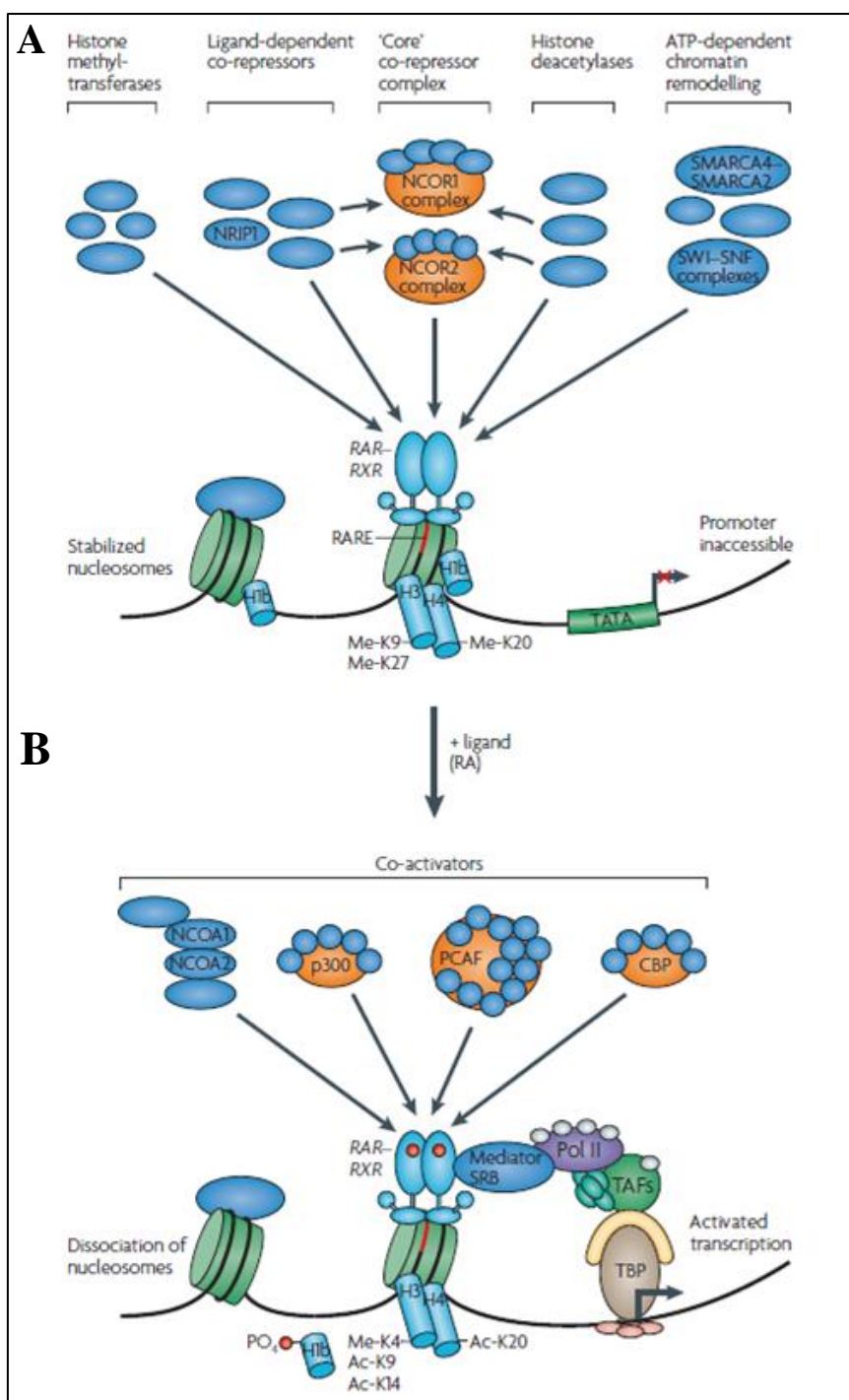


Figure 13 : Exemple d'interactions récepteurs/co-facteurs avec l'acide rétinoïque.

Source : Niederreither and Dollé, (2008)

A. En l'absence de ligand, l'hétérodimère RAR-RXR se lie à l'élément de réponse RARE et recrute des co-répresseurs (NCOR1 et NCOR2). Ces derniers répriment la transcription en recrutant des complexes histones déacetylases et méthyltransférases qui rendent l'ADN inaccessible pour la transcription. **B.** La liaison du récepteur avec son ligand entraîne des changements conformationnels du LBD permettant la libération des co-répresseurs et le recrutement des co-activateurs (p300 et CBP). Ces derniers vont alors interagir avec la machinerie transcriptionnelle et induire le remodelage de la chromatine, activant ainsi la transcription.

II.3.2. Auto-régulation

Concernant les rétinoïdes : la concentration en AR détermine le taux d'expression de certains gènes codant pour ses propres récepteurs : c'est le cas des RXR α , RXR β et RXR γ (Wan et al., 1994; Duprez et al., 1996). Concernant les RAR, l'expression de RAR β est fortement induite par l'acide tout-*trans*rétinoïque *in vitro* alors que celle de RAR α n'est pas affectée (de The et al., 1989). Plusieurs études effectuées chez des animaux carencés en vitamine A montrent une diminution de l'expression des RAR β , leur réinduction après l'administration d'AR (Haq et al., 1991), et aucune modification des autres isotopes RAR α et RAR γ (Kato et al., 1992a; Kato et al., 1992b). Il semble en effet que ces isotopes soient peu sensibles à l'administration d'AR tout-*trans* et ne s'expriment qu'en présence d'une forte concentration de cet acide (Mangelsdorf, 1994). D'autres études physiologiques ont confirmé le phénomène d'autorégulation des récepteurs RAR β *in vivo* dans différents tissus (Enderlin et al., 1997a; Enderlin et al., 1997b). Enfin, une étude récente a révélé une surexpression de certains récepteurs des rétinoïdes en particulier RAR α et RXR α dans plusieurs structures cérébrales (Striatum, Amygdale, Hypothalamus et Hippocampe), induite par une carence en vitamine A (Arfaoui et al., 2013). Ainsi, il apparaît qu'une diminution de concentration des niveaux intracellulaires d'AR pourrait induire une régulation transcriptionnelle à la fois négative ou positive de certains récepteurs des rétinoïdes.

Concernant les glucocorticoïdes : le rétrocontrôle négatif des glucocorticoïdes caractérisé par un excès de l'hormone va engendrer une action inhibitrice sur les ARNm des GR et MR. A l'inverse, dans le cas où les glucocorticoïdes sont diminués, les ARNm des récepteurs vont être augmentés. Ainsi, de nombreux articles ont montré une augmentation quantitative d'ARNm mais également de protéines (Chao et al., 1989; Spencer et al., 1991; Holmes et al., 1995; Hansson et al., 2000; Paskitti et al., 2000).

II.3.3. Hétérodimérisation et hétérorégulation

Concernant les rétinoïdes : le RXR joue un rôle central dans la régulation génique puisqu'il est considéré comme le partenaire commun de dimérisation avec d'autres membres de la superfamille dont les RAR. Ce partenaire commun souligne l'importance du signal rétinoïde qui est placé au centre d'un réseau de signaux multihormonaux complexe. Ainsi, l'hétérodimérisation entre les récepteurs permet une hétérorégulation entre différentes voies

hormonales (rétinoïde, thyroïdienne). Les hétérodimères RAR/RXR et TR/RXR sont les principaux médiateurs de l'action transactivatrice de l'AR et de la triiodothyronine (T3) sur la transcription (Glass, 1994). Des interactions existent aussi entre les récepteurs nucléaires et les voies de signalisation de second messager cellulaire. A titre d'exemple, une synergie a été mise en évidence entre la voie de l'adénylate cyclase AMPc/PKA et les RAR, GR, ER VDR et TR (Leitman et al., 1996).

Concernant les glucocorticoïdes : certaines études ont également montré une hétérodimérisation entre les GR et les MR (Trapp et al., 1994; Liu et al., 1995; Ou et al., 2001). Il semblerait que ces hétérodimères soient localisés dans une région spécifique du noyau et qu'ils soient recrutés en condition d'hypercortisolémie (Nishi and Kawata, 2006). Leur rôle fonctionnel n'est pas encore à ce jour clairement défini mais il a été suggéré par certains auteurs qu'ils seraient capables de réguler plus finement l'action génomique des glucocorticoïdes que les homodimères GR ou MR, notamment en adaptant l'action des glucocorticoïdes sur la transcription génomique en fonction de leurs concentrations intracellulaires (Datson et al., 2008).

II.4. Distribution tissulaire et cérébrale des récepteurs nucléaires

II.4.1. Distribution tissulaire et cérébrale des récepteurs nucléaires à l'AR

II.4.1.1. Distribution tissulaire

La distribution des différentes isoformes des récepteurs nucléaires de l'AR dans les différents tissus cibles est spécifique (Germain et al., 2006c, b). Concernant les RAR, les transcrits du RAR α sont retrouvés de manière ubiquitaire dans les tissus, ceux de la forme β sont plutôt restreints au cerveau, foie, reins et poumons, tandis que ceux de la forme γ sont spécifiques de la peau et des poumons (Dolle et al., 1990). Concernant les RXR, l'expression du RXR α est forte dans le foie mais non négligeable dans les reins, les poumons, la rate et les muscles. Par contre RXR β présente une distribution ubiquitaire, même s'il est plus faiblement exprimé dans le foie, l'intestin et les testicules. Enfin, RXR γ est exprimé de manière plus restreinte au niveau des muscles et du cerveau (Szanto et al., 2004; Germain et al., 2006c).

II.4.1.2. Distribution cérébrale

De nombreuses études se sont intéressées à la distribution cellulaire des récepteurs à l'acide rétinoïque dans le cerveau de rongeur adulte (Krezel et al., 1999; Zetterstrom et al., 1999; Moreno et al., 2004; Lane and Bailey, 2005; Arfaoui et al., 2013) (Tableau 2). Ainsi, Yamagata et al. en 1993 ont montré que l'isoforme RAR β est la plus exprimée dans le cerveau mature de rat alors que les isotypes RAR γ , RXR α , RXR β seraient peu présents. Plus précisément, il en ressort que, par exemple, l'isotype RAR α serait fortement exprimé au niveau de l'hippocampe et du cortex. Des niveaux élevés de RAR β et RXR γ ont été détectés plus particulièrement dans le striatum et l'amygdale de rat. RAR β serait présente à des taux très bas dans l'hippocampe. Par la suite, les transcrits de l'isoforme RAR β ainsi que la protéine ont été détectés dans l'hippocampe (Enderlin et al., 1997a; Enderlin et al., 1997b; Chiang et al., 1998; Etchamendy et al., 2001; Arfaoui et al., 2013). Ainsi, la présence de ces récepteurs dans les différentes structures cérébrales de manière différentielle suggère des rôles spécifiques de ces récepteurs dans les fonctions du cerveau adulte.

Tableau 2 : Répartition des protéines de liaison et des récepteurs à l'AR dans le cerveau.

Source : Lane and bailey, (2005)

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

^a Table summarizes protein distribution of retinoid binding proteins and receptors. Gene expression data are not included.

II.4.2. Distribution tissulaire et cérébrale des récepteurs nucléaires aux glucocorticoïdes

II.4.2.1. Distribution tissulaire

L'expression des ARNm et des protéines GR et MR a été détectée dans de nombreux tissus si bien que leur présence semble ubiquitaire dans l'organisme. Ils sont notamment retrouvés au niveau des reins, des intestins, des glandes surrénales, des cellules du système immunitaire, des os, du cœur, des muscles, de la peau, du cerveau ou encore dans le tissu adipeux (Odermatt and Kratschmar, 2012).

II.4.2.2. Distribution cérébrale

Dans le cerveau adulte, l'expression des GR est ubiquitaire alors que les MR semblent restreints aux structures du système limbique incluant l'hippocampe, l'amygdale, le septum et quelques aires corticales (de Kloet et al., 2005; Datson et al., 2008). L'expression des ARNm et des protéines GR semble toutefois plus élevée au niveau de l'hippocampe, l'amygdale, le cortex et le septum par rapport aux autres structures cérébrales (Morimoto et al., 1996).

II.5. Les gènes cibles régulés par l'acide rétinoïque et les glucocorticoïdes

II.5.1. Rétinoïdes et cerveau adulte

Outre leur implication dans la vision, l'immunité ou encore les processus de développement embryonnaire et de croissance cellulaire (Maden and Hind, 2003), les rétinoïdes jouent un rôle important dans le cerveau adulte. Des études menées sur des modèles de cellules pluripotentes se différenciant sous l'effet de l'AR ont permis de mettre en évidence son implication dans la régulation d'un certain nombre de gènes cibles (*Tableau 3*). Si pour certains d'entre eux, l'existence d'un RARE dans leur séquence promotrice a pu être mis en évidence, pour d'autres cela reste à confirmer.

Parmi les gènes cibles des rétinoïdes figurent des gènes codant pour des protéines impliquées dans les processus de neurogenèse telles que les facteurs de croissance, NGF et

BDNF, et leurs récepteurs respectifs le TrkA et le TrkB (Scheibe and Wagner, 1992) mais également des gènes impliqués dans les processus de plasticité synaptique tels que RC3, GAP43. En effet, il a été montré une corrélation entre le niveau d'expression de GAP43 et l'expression des récepteurs RAR β (Grummer and Zachman, 2000) et un élément de réponse à l'AR a été mis en évidence dans le promoteur du gène de RC3 (Iniguez et al., 1994). Ces protéines jouent un rôle important dans les processus de mémorisation et leur rôle sera détaillé dans le chapitre IV.

Cependant, afin de déterminer si ces gènes sont directement sous la régulation de l'AR, il reste un travail considérable à réaliser pour identifier de façon évidente l'existence d'un RARE dans leur séquence génomique.

II.5.2. Glucocorticoïdes et cerveau adulte

Datson et al., (2001) se sont intéressés aux différents gènes pouvant être régulés par les homodimères GR ou MR et par les hétérodimères GR/MR au niveau de l'hippocampe. Il en ressort que plus de 200 gènes seraient sous le contrôle des glucocorticoïdes en considérant uniquement cette structure. Ces gènes sont impliqués dans de très nombreuses fonctions biologiques (Morsink et al., 2006) dont les processus de plasticité synaptique hippocampique. Ces interactions entre la voie de signalisation des glucocorticoïdes et la plasticité synaptique hippocampique ne sont pas nouvelles, en effet des études antérieures portant sur des rats ayant subi une surrénalectomie (ablation des glandes surrénales) avaient déjà montré des variations d'expression de certains gènes de plasticité synaptique tels que BDNF ou encore GAP43 (Chao and McEwen, 1994; Chao et al., 1998). Par ailleurs, plus récemment il a été montré une diminution des niveaux protéiques de PSD-95 dans l'hippocampe induite par une administration chronique de corticostérone (Cohen et al., 2011).

Au même titre que pour les rétinoïdes, il reste un travail considérable à réaliser pour mettre en évidence une régulation directe des glucocorticoïdes sur l'expression de tous ces gènes. Ceci pourrait passer par l'identification de la présence de séquences GRE ou nGRE sur les gènes cibles, mais également par la mise en évidence de domaines de liaison spécifiques aux glucocorticoïdes au niveau des facteurs de transcription (Datson et al., 2008).

Tableau 3 : Quelques gènes régulés par l'acide rétinoïque.

Source : Lane and bailey, (2005)

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

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

II.6. Les récepteurs membranaires

Comme nous venons de le voir tout au long de ce chapitre, le mode d'action des rétinoïdes et des glucocorticoïdes se traduit principalement par des effets génomiques. Il est important de noter que ces voies de signalisation régulent également un certain nombre de mécanismes cellulaires par des processus non-génomiques qui seraient sous-tendus par des récepteurs membranaires.

Concernant les rétinoïdes : il a été montré que l'isoforme RAR α exprimé au niveau de la membrane pourrait être impliqué dans la formation et la croissance d'épines dendritiques ou encore la formation de nouvelles synapses en modulant la traduction des récepteurs au glutamate AMPA (Chen and Napoli, 2008; Chen et al., 2008; Maghsoodi et al., 2008; Shearer et al., 2012). Ainsi, le RAR α serait fixé sur l'ARNm des récepteurs AMPA bloquant leur traduction. La liaison de l'AR au RAR α permettrait de lever cette inhibition.

Concernant les glucocorticoïdes : Il a été découvert un autre type de récepteurs aux hormones glucocorticoïdes localisés sur la membrane plasmique. Ce sont des récepteurs de

type MR (Joels et al., 2008) qui contrairement aux récepteurs MR nucléaires présentent une faible affinité pour les glucocorticoïdes comparable à celle des GR nucléaires (Karst et al., 2005). Ainsi ils sont activés lorsque les niveaux de l'hormone augmentent comme pour les GR, par exemple en réponse à un stress. Les premières études ont montré, comme pour les rétinoides, une interaction avec le système glutamatergique. En effet, les modes d'actions semblent sensiblement similaires puisqu'ils seraient capables d'augmenter la neurotransmission glutamatergique et de réguler le trafic de surface des récepteurs de type AMPA, augmentant ainsi la transmission en jouant sur les processus de plasticité synaptique hippocampique (Groc et al., 2008; Krugers et al., 2010; Chaouloff and Groc, 2011). Enfin, une récente étude a mis en évidence l'implication de ce type de récepteur hippocampique dans les effets délétères des glucocorticoïdes en réponse au stress sur la mémoire de travail (Dorey et al., 2011).

Résumé

La présence dans le cerveau adulte de l'appareil biochimique associé au métabolisme et au système de réponse de l'AR conforte l'idée que la vitamine A pourrait jouer des rôles essentiels dans les fonctions cérébrales. Les récepteurs nucléaires de la vitamine A présentent une distribution cérébrale spécifique et sont capables d'induire la transcription de nombreux gènes cibles qui interviennent dans des processus essentiels. Les données bibliographiques révèlent aussi que certains récepteurs nucléaires sont fortement exprimés dans l'hippocampe suggérant leur rôle important dans la régulation des processus mnésiques hippocampo-dépendants. Nous avons souligné également le fait que les deux voies de signalisation rétinoides et glucocorticoïdes partagent l'existence de récepteurs nucléaires appartenant à la même superfamille et anatomiquement localisés, au moins en partie, au sein des mêmes tissus cérébraux. Par ailleurs, elles partagent également des modes d'action très similaires qui aboutissent à la régulation d'un certain nombre de gènes communs. Toutes ces observations suggèrent l'existence de possibles interactions entre ces deux voies de signalisation lors des processus de mémorisation.

CHAPITRE III. VITAMINE A, GLUCOCORTICOÏDES ET VIEILLISSEMENT CÉRÉBRAL

Le nombre de personnes âgées ne cesse d'augmenter dans les pays industrialisés, conséquence de la prévention faite sur les problèmes de santé (Schneider, 1999). Ces observations contribuent au développement de nouvelles perspectives de recherche concernant les mécanismes du vieillissement (Alperovitch et al., 2002; Helmer et al., 2003).

L'identification des altérations neurobiologiques responsables des dysfonctionnements mnésiques observés chez le sujet âgé constitue l'un des objectifs majeurs des recherches actuelles sur le vieillissement cérébral. Ces altérations de plasticité cérébrale ont été particulièrement étudiées au niveau de l'hippocampe, une structure clé dans les processus d'apprentissage et de mémoire. De plus, cette structure apparaît être une cible privilégiée des rétinoïdes et des glucocorticoïdes.

III.1. Mémoire, hippocampe, et plasticité cérébrale au cours du vieillissement

III.1.1. Hippocampe et processus mnésiques

III.1.1.1. La mémoire

La mémoire est une fonction complexe dépendant de l'intégrité de plusieurs structures cérébrales. En psychologie, il a été proposé de distinguer deux grands types de mémoire : la mémoire à court terme et la mémoire à long terme. *La mémoire à long terme*, par opposition à *la mémoire à court terme*, est la capacité à retenir une information pendant une durée beaucoup plus importante.

Squire en 1992 a proposé une classification dichotomique de la mémoire à long terme. Même si elle a été améliorée au cours de ces dernières années, la classification a peu évolué (Squire, 2004; Henke, 2010), et reste encore la plus communément utilisée de nos jours. Elle sépare la mémoire à long terme en deux grands sous-systèmes : *la mémoire déclarative* et la *mémoire non-déclarative* (Figure 14). Ces différents systèmes de mémoire, systèmes interactifs, se différencient par leur mode de codage, de stockage et de rappel de l'information ainsi que par les structures cérébrales qu'ils mettent en jeu (McDonald et al., 2004).

Chez l'Homme, *la mémoire déclarative*, également appelée mémoire explicite est accessible à la conscience. Elle dépend essentiellement de l'intégrité du lobe temporal médian et est divisée en deux sous-mémoires : la mémoire sémantique et la mémoire épisodique. Ce système de mémoire, relativement bien défini anatomiquement, implique des interactions entre les structures corticales et les régions sous corticales limbiques, dont l'hippocampe. Alors que la mémoire sémantique regroupe nos connaissances générales des faits publics (Quoi ?), la mémoire épisodique quant à elle, constitue nos souvenirs autobiographiques et intègre une notion spatiale et temporelle à ceux-ci (Quoi, Où et Quand ?). Ainsi l'hippocampe interviendrait dans ce type de mémoire en permettant la mémorisation des faits et événements dans un contexte spatio-temporel et/ou de les lier entre eux (notion de *mémoire relationnelle*).

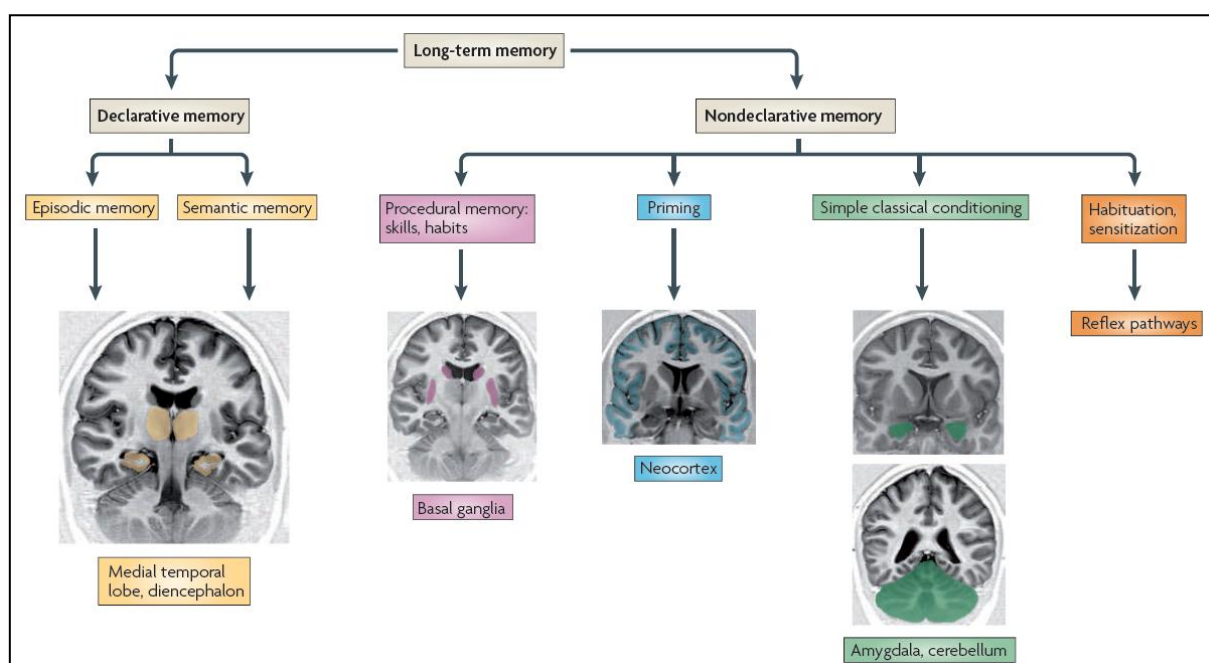


Figure 14 : Classification des systèmes de la mémoire à long terme.

Source : Henke, (2010)

Chez l'animal, la mémoire déclarative n'est pas évaluable en tant que telle car elle constitue par définition, une mémoire verbalisable, permettant d'exprimer des souvenirs. Deux stratégies peuvent alors être mises en œuvre afin de la modéliser chez l'animal. La première vise à réduire la mémoire déclarative à ses propriétés élémentaires (Quoi, Où et Quand?), et à interroger l'animal dans des paradigmes comportementaux testant spécifiquement l'une ou plusieurs de ces propriétés. La seconde consiste en l'étude de la capacité de l'animal à réaliser des tâches d'apprentissage et de mémoire dépendantes de

l'intégrité de l'hippocampe, structure cérébrale sous-tendant chez l'homme la mémoire déclarative.

III.1.1.2. L'hippocampe

L'hippocampe est une structure cérébrale télencéphalique bilatérale située dans le lobe temporal médian. Il appartient au système limbique, un ensemble de structures impliquées dans l'intégration de processus cognitifs tels que les émotions ou la mémoire.

L'hippocampe est formé de deux structures : le gyrus dentelé (GD) et la corne d'Ammon (CA). Sur la base de différences morphologiques et de ses connexions synaptiques, la CA est subdivisée en trois parties : CA1, CA2, CA3. Le GD est constitué de cellules granulaires alors que les CA sont principalement composées de cellules pyramidales. Ces deux populations cellulaires représentent 88% des cellules hippocampiques. Les autres cellules présentes au niveau de l'hippocampe sont pour la plupart des neurones GABAergiques (Somogyi and Klausberger, 2005). Dans l'hippocampe, le flux d'information est unidirectionnel. Le circuit le plus simple, également appelé circuit de Papez, est constitué d'une voie principale excitatrice tri-synaptique mettant en jeu plusieurs groupes de neurones (*Figure 15*).

(1) Les cellules pyramidales du cortex entorhinal projettent au niveau des cellules granulaires du gyrus dentelé. Ces projections axonales sont également appelées fibres perforantes. C'est la voie d'entrée du circuit.

(2) Les axones des cellules granulaires, également appelés fibres moussues, projettent au niveau des cellules pyramidales de l'aire CA3. Les axones de ces cellules se ramifient en deux parties : une partie forme les fibres commissurales projetant vers l'hippocampe controlatéral via le corps calleux et l'autre partie forme les collatérales de Schaffer qui vont connecter les cellules de l'aire CA1.

(3) Les neurones du CA1 projettent hors de l'hippocampe par le fornix, vers le subiculum qui contacte en retour au niveau du cortex entorhinal fermant ainsi la boucle anatomique. C'est la voie de sortie du circuit et l'information peut ainsi retourner vers les aires corticales d'où elle provenait.

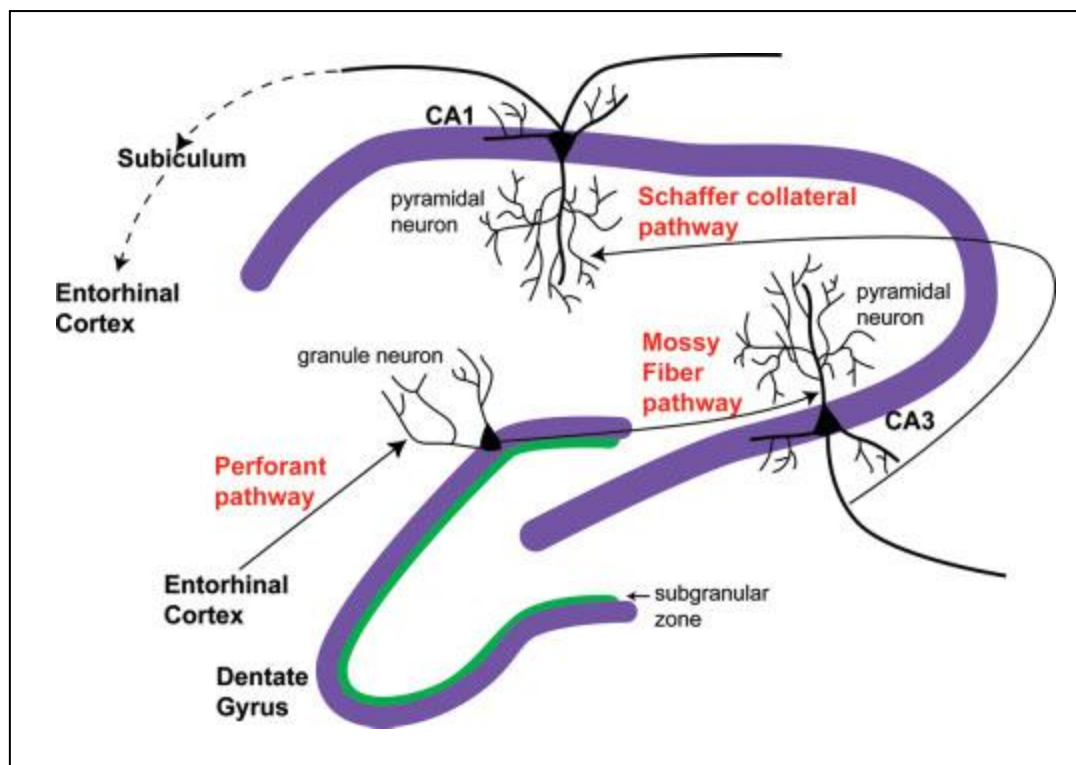


Figure 15 : La formation hippocampique.

Source : McCaffery et al., (2006)

Au sens strict du terme, l'ensemble formé par le GD, les CA, le complexe subiculaire (subiculum, parasubiculum, présubiculum) et le cortex entorhinal constitue la formation hippocampique (FH).

III.1.1.3. Rôle de l'hippocampe

Les travaux menés chez l'animal ont permis d'envisager plusieurs théories sur la fonction de l'hippocampe et sur la façon dont les systèmes cérébraux qui lui sont associés seraient chargés d'assurer le traitement et la mise en mémoire des informations.

La théorie des cartes spatiales. Cette théorie envisage que l'hippocampe ait pour fonction principale d'encoder et de stocker les informations spatiales pour la formation et l'utilisation de cartes cognitives de l'environnement (O'Keefe and Conway, 1978; Morris et al., 1986a). L'un des arguments en faveur de cette théorie a été la découverte des cellules dites "de lieu" dans l'hippocampe, cellules ayant la spécificité d'encoder l'information spatiale et

de ne décharger que lorsque l'animal se trouve à un emplacement précis dans l'espace dans lequel il évolue (O'Keefe and Dostrovsky, 1971; O'Keefe and Conway, 1978; Jarrard, 1993). Cette population de cellules "de lieu" permettrait la formation "d'une carte cognitive" de l'environnement de l'animal (Wood and Dudchenko, 2003). C'est pourquoi l'intégrité de l'hippocampe est requise lors de stratégie dite de type allocentrique grâce à laquelle les lieux sont localisés au sein d'une carte spatiale fondée sur les relations de position entre les indices visuels présents dans l'environnement. De nombreuses données étayent cette théorie en montrant notamment que l'hippocampe joue un rôle critique dans la mémoire spatiale, à la fois chez l'Homme et le rongeur (Maguire et al., 1996b; Maguire et al., 1996a; Abrahams et al., 1997; Maguire et al., 1998). Plus précisément, il a été démontré que l'apprentissage et la mémoire spatiale sont plus particulièrement dépendants de l'hippocampe dorsal (Moser et al., 1993), au niveau duquel la neurotransmission cholinergique occupe une place importante (Cassel et al., 1997; Bartus, 2000).

La mémoire spatiale chez l'animal a largement été étudiée en utilisant des tests comportementaux comme l'utilisation d'une épreuve de navigation dans le labyrinthe aquatique de Morris (Morris, 1984; D'Hooge and De Deyn, 2001). En effet, ce test permet d'évaluer l'aptitude de l'animal à établir une représentation spatiale basée sur l'encodage des relations existant entre différentes informations. Au cours du test, l'animal doit encoder l'environnement sous forme d'une carte spatiale afin de localiser l'emplacement d'une plateforme immergée. L'implication de l'hippocampe dans cette épreuve de navigation spatiale a été montrée par des études lésionnelles (Morris et al., 1982; Moser et al., 1995; de Hoz et al., 2005), des études pharmacologiques (Morris et al., 1986b; Riedel et al., 1999; Micheau et al., 2004), de transgénèse (Sakimura et al., 1995; Tsien et al., 1996; Cho et al., 1998), d'électrophysiologie (O'Keefe and Dostrovsky, 1971; O'Keefe and Conway, 1978; Moser et al., 1998) ou bien encore à l'aide de marqueurs d'activité cellulaire (Guzowski et al., 2000; Guzowski et al., 2001; Teixeira et al., 2006).

La théorie de la mémoire relationnelle. Elle suggère que l'hippocampe est impliqué dans des processus plus généraux de gestion de l'information regroupés sous le terme de mémoire relationnelle (Eichenbaum et al., 1990; Marighetto et al., 1999; Etchamendy et al., 2003a; Touzani et al., 2003). Cette forme de mémoire plus générale ne serait pas limitée au seul traitement des informations spatiales et permettrait la mise en relation d'informations retenues en mémoire et de les utiliser dans une nouvelle situation (Eichenbaum and Cohen, 1988).

L'équipe du Dr D.Béracochea a également développé un test de mémoire contextuelle chez la souris (Test de Discrimination Spatiale Contextuelle et Sérielle, DSCS), permettant de détecter précocement les déficits mnésiques liés à l'âge (Tronche et al., 2010). Dans ce type de tâche, il y a association entre le contexte interne et la localisation spatiale d'un trou appâté par de la nourriture présenté dans un ordre sériel, permettant ainsi d'évaluer la mémoire sérielle contextuelle de type épisodique (Beracochea et al., 2007). Des études lésionnelles montrent que l'hippocampe jouerait également un rôle primordial dans ce type de mémoire contextuelle (Chauveau et al., 2009a).

III.1.2. Plasticité cérébrale hippocampique et processus mnésiques

Il est maintenant bien établi que les processus d'apprentissage et de mémoire nécessitent la mise en place de modifications durables et la constitution de réseaux neuronaux permettant de sous tendre l'information. Les processus conduisant à ces transformations sont regroupés sous le terme de plasticité cérébrale qui inclut à la fois la plasticité synaptique et la neurogenèse.

III.1.2.1. Plasticité synaptique hippocampique et processus mnésiques

La plasticité synaptique se définit comme la capacité des neurones à modifier leurs propriétés (morphologiques, chimiques et fonctionnelles) au cours du temps. L'hippocampe, structure clé dans les processus d'apprentissage a été largement décrite comme étant le siège de phénomènes de plasticité synaptique (Morris, 2006).

La potentialisation à long terme (PLT) est la première forme de plasticité synaptique mise en évidence chez le mammifère (Bliss and Lomo, 1973). Elle se caractérise par une augmentation rapide et durable de l'amplitude des potentiels post-synaptiques (au niveau extracellulaire) enregistrés dans le gyrus dentelé mais également par une diminution du seuil d'induction du potentiel d'action. Cette PLT n'est observée qu'après une stimulation "tétanique" (stimulation à haute fréquence) des fibres perforantes et n'a pas seulement été montrée que dans le GD mais également dans les différentes régions de l'hippocampe : CA1 (Izquierdo et al., 2008), CA3 (Dumas and Foster, 1995).

L'hypothèse selon laquelle la PLT sous-tendrait la formation de la mémoire a été appuyée par de nombreuses études. En effet, des mesures de PLT dans l'hippocampe ont été corrélées avec les niveaux de performance des animaux dans de nombreux tests

d'apprentissage et de mémoire spatiale (Jaffard and Jeantet, 1981; Jodar and Kaneto, 1995; Jaffard et al., 1996).

Il existe plusieurs formes de PLT mais dans les régions CA1 et GD, la PLT la plus décrite est celle dépendante de l'activation des récepteurs au glutamate NMDA (Zhong et al., 2006; Drever et al., 2011). Le phénomène de PLT-NMDA peut être décrit de la manière suivante : (1) une stimulation à haute fréquence de la région pré-synaptique entraîne une libération de glutamate au niveau de la synapse. (2) La fixation du glutamate sur les récepteurs AMPA et NMDA entraîne une dépolarisation au niveau synaptique. (3) La dépolarisation post synaptique associée à la fixation du glutamate sur le récepteur NMDA va induire une ouverture des canaux et ainsi l'entrée de Ca^{2+} dans la cellule. (4) L'augmentation intracellulaire de Ca^{2+} dans la cellule va être à l'origine de l'activation d'une cascade moléculaire de signalisation aboutissant à des mécanismes de synthèse protéique. Les conséquences qui en résultent sont des changements durables de l'efficacité de la transmission du signal qui peuvent se traduire par exemple au niveau pré-synaptique par une augmentation de la libération de neurotransmetteurs ou au niveau post-synaptique par le recrutement de récepteurs glutamatergiques (*figure 16*). La transcription de gènes codant pour des protéines impliquées dans la facilitation de la transmission suite à une PLT a également été mise en évidence. Parmi ces molécules de signalisation, certaines se retrouvent au niveau pré-synaptique comme synaptophysine et neuromoduline (GAP43), et d'autres sont situées dans le compartiment post-synaptique comme PSD-95 et neurogranine (RC3). Par ailleurs, d'autres protéines telles que les facteurs de croissance BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor) ou encore NGF (Nerve Growth Factor) jouent également un rôle important dans les processus de plasticité synaptique.

La *synaptophysine* est une protéine pré-synaptique exprimée de manière ubiquitaire et impliquée dans le relargage des vésicules au niveau de la synapse. Elle joue un rôle important dans les processus mnésiques, puisque il a été montré que des souris KO pour le gène présentaient des altérations comportementales (Schmitt et al., 2009).

La *neuromoduline (GAP43)* est présente dans l'hippocampe et est exprimée majoritairement au niveau présynaptique (Casoli et al., 2001). La protéine kinase C (PKC) est responsable de sa phosphorylation et des travaux ont montré une augmentation de la forme phosphorylée après l'induction de PLT (Ramakers et al., 2000). Elle serait impliquée dans la libération de neurotransmetteurs (Benowitz and Routtenberg, 1997). Par ailleurs, d'autres

études ont montré une corrélation entre le niveau d'expression de GAP43 et les performances d'apprentissage (Routtenberg et al., 2000; Quattrone et al., 2001; Rekart et al., 2005).

PSD-95 (Post-Synaptic Density protein) est une protéine d'échafaudage située dans la densité post-synaptique. Elle est entre-autre impliquée dans la stabilisation des récepteurs au glutamate au niveau de la membrane et indispensable pour induire les processus de PLT ; elle joue donc un rôle clé dans la plasticité synaptique et la mémoire (Migaud et al., 1998; Carlisle et al., 2008; Keith and El-Husseini, 2008; Soule et al., 2008).

La *Neurogranine (RC3)* est une protéine fortement exprimée dans la densité post-synaptique des épines dendritiques au niveau hippocampique (Watson et al., 1994; Singec et al., 2004). De la même manière que pour GAP43, cette protéine est phosphorylée par la PKC et il a été suggéré que sa phosphorylation serait responsable d'une mobilisation calcique interne qui aboutirait à la PLT (Gerendasy and Sutcliffe, 1997; Huang et al., 2004). Par ailleurs, il a également été montré dans d'autres études que la délétion du gène codant pour RC3 altérait la PLT et provoquait des déficits d'apprentissage (Pak et al., 2000; Miyakawa et al., 2001; Huang et al., 2006).

Le facteur trophique *Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)* est une protéine sécrétée au niveau les compartiments pré- et post-synaptiques en réponse à une stimulation neuronale (Hartmann et al., 2001; Kohara et al., 2001; Kojima et al., 2001). Ses récepteurs, TrkB, sont également présents dans les deux régions (Drake et al., 1999). De nombreuses études montrent le rôle critique de BDNF dans l'induction de la PLT (Kang and Schuman, 1995; Figurov et al., 1996; Patterson et al., 1996) en particulier au niveau de la région CA1 (An et al., 2008) mais également dans les processus de mémorisation dépendants de l'hippocampe (Tyler et al., 2002; Yamada and Nabeshima, 2003).

Le facteur trophique *Nerve Growth Factor (NGF)* appartient à la même famille de protéine que BDNF et présente donc des propriétés similaires. Elle se fixe préférentiellement aux récepteurs TrkA et son rôle dans les processus de PLT au niveau hippocampique a été démontré dans plusieurs études (Maguire et al., 1999; Hennigan et al., 2009). Par ailleurs, une augmentation de son expression a été associée à une amélioration des performances mnésiques chez l'animal âgé en particulier (Fischer et al., 1991; Woolf et al., 2001).

Parmi ces facteurs, il a déjà été mis en évidence pour certains d'entre eux une régulation par les rétinoïdes et les glucocorticoïdes. C'est le cas par exemple de RC3 pour lequel des séquences RARE et GRE ont été mises en évidence dans la région promotrice (Iniguez et al., 1994) mais on retrouve également GAP43, TrkA, BDNF (Chao and McEwen, 1994; Chao et al., 1998; Feart et al., 2005a; Bonnet et al., 2008; Brossaud et al., 2013).

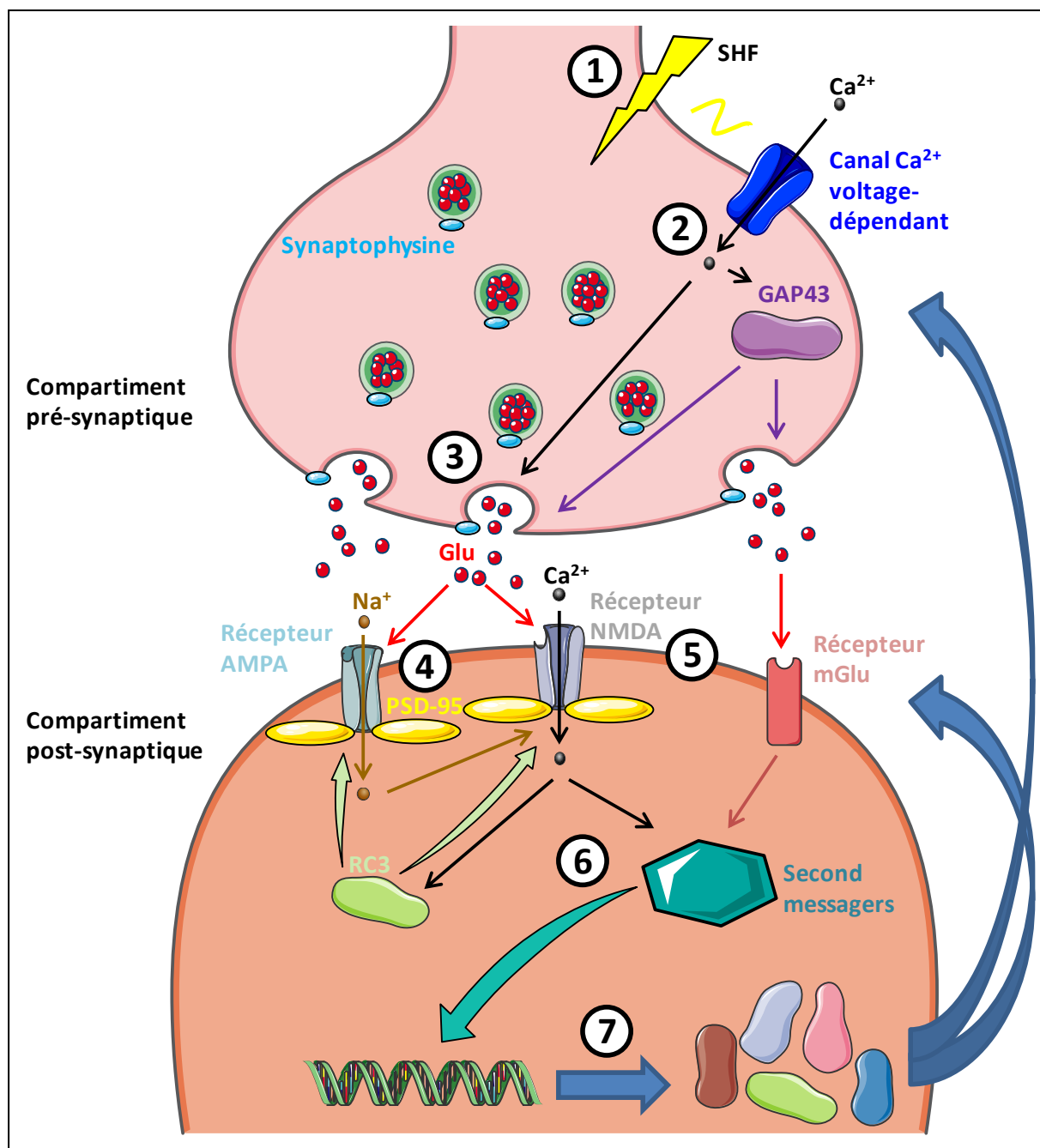


Figure 16 : Mécanismes d'action de la PLT.

1. La stimulation à haute fréquence (SHF) induit l'activation des canaux Ca^{2+} voltage-dépendant. **2.** Entrée de Ca^{2+} dans le compartiment pré-synaptique. **3.** Le Ca^{2+} agit indirectement sur GAP43 et sur la libération vésiculaire de glutamate. **4.** Fixation du neurotransmetteur (Glu : Glutamate) sur les récepteurs AMPA, dont l'action très rapide aboutit à l'entrée de Na^{+} dans le compartiment post-synaptique. Cette entrée va générer un courant à l'origine de l'activation des récepteurs NMDA. **5.** La fixation de glutamate sur les NMDA ainsi activés permet l'entrée de Ca^{2+} dans le compartiment post-synaptique activant comme pour les récepteurs mGlu (RCPG) une cascade de seconds messagers. **6.** Ces deux actions vont aboutir à la transcription génomique. **7.** Les protéines ainsi codées vont favoriser la transmission synaptique de manière durable.

III.1.2.2. Neurogenèse adulte hippocampique et processus mnésiques

Généralités sur la neurogenèse hippocampique

La neurogenèse se définit comme l'ensemble des processus conduisant à l'intégration fonctionnelle de néo-neurones dans les circuits cérébraux. Les travaux démontrant l'existence de la formation de nouvelles cellules, à la morphologie similaire à celle des neurones, dans différentes régions du cerveau adulte telles que le GD de la formation hippocampique, le néocortex et le bulbe olfactif datent des années 60 (Altman, 1962). Depuis cette découverte, différentes études ont confirmé le fait que les nouveaux neurones étaient produits tout au long de la vie, et sur la base de données obtenues *in vitro* et au cours du développement, il a été montré que deux types de cellules semblent capables de se diviser : les cellules souches et les cellules progénitrices.

Les cellules souches sont des cellules indifférenciées, capables de proliférer et de se renouveler en donnant naissance par division asymétrique à une cellule souche identique à elle-même et à une cellule fille plus spécialisée pouvant elle-même donner naissance à différents types cellulaires.

Les cellules progénitrices sont les progénitures précoces des cellules souches. Elles se différencient de ces dernières de part leur incapacité à se renouveler. En revanche elles sont tout à fait capables de se différencier par division symétrique.

In vivo, chez l'adulte il est actuellement très difficile de faire la différence entre les cellules souches et les cellules progénitrices, le terme de précurseur est alors employé pour caractériser ces deux types cellulaires.

La neurogenèse hippocampique du cerveau adulte prend son origine dans la zone sous-granulaire du gyrus dentelé (GD). Elle se déroule en trois étapes. Brièvement, les cellules se divisent à plusieurs reprises, au moins pendant les quatre jours qui suivent leur naissance. A l'issue de la prolifération, environ 40% des cellules survivent. Elles migrent ensuite de façon tangentielle vers la couche granulaire où elles vont se différencier pour s'insérer dans le réseau préexistant (Cameron et al., 1993; Dayer et al., 2003) (*figure 17*). Il est estimé que les cellules formées chaque jour dans le GD représentent moins de 1% de la population totale des cellules granulaires (Cameron and McKay, 2001; Rao and Shetty, 2004). De plus, seule une

faible proportion des néo-neurones produits quotidiennement survit sur le long terme. Plus de 50% des cellules néo-formées vont périr au cours des deux premières semaines de leur vie (Cameron et al., 1993; Gould et al., 1999; Dayer et al., 2003). Par contre, celles qui survivent restent stables pendant plusieurs mois (8 à 10 mois) (Dayer et al., 2003; Kempermann et al., 2003) et deviennent majoritairement des neurones granulaires probablement glutamatergiques, une faible proportion se différencierait en neurones GABAergiques (Liu et al., 2003), en astrocytes ou en microglie (Cameron et al., 1993; Steiner et al., 2004).

La neurogenèse résulte de plusieurs étapes successives :

- *La prolifération*, est la formation de nouvelles cellules à partir de précurseurs. Elle est étudiée après sacrifice des animaux pour des délais courts (1 à 24h) après l'injection de BrdU (5-bromo-2'-déoxyuridine), un analogue de la thymidine qui s'incorpore dans l'ADN des cellules en division, (Kee et al., 2002) ou encore en utilisant des marqueurs du cycle cellulaire comme le Ki-67 (Scholzen and Gerdes, 2000; Kee et al., 2002), le PCNA (Proliferating Cell Neuronal Antigen) ou l'histone 3 phosphorylée.

- *La survie* des cellules néoformées est étudiée après sacrifice des animaux à des délais variant de quelques jours à plusieurs mois après l'injection de BrdU.

- *La migration et la différenciation* des cellules néoformées en cellules matures de phénotype neuronal ou glial peuvent également être évaluées après injection de BrdU.

Il existe plusieurs types de marqueurs cellulaires, certains sont présentés sur la *figure 17*, qui permettent d'évaluer le stade de neurogenèse des cellules (Abrous et al., 2005; Christie and Cameron, 2006; von Bohlen Und Halbach, 2007).

Ainsi, la *Nestine* ou le *Msi1* (mouse-Musashi1) sont exprimés spécifiquement dans les précurseurs. La *DCX* (doublecortine) ou la *TuJ1* sont présentes dans les neurones immatures (exprimés précocement au cours de la différenciation). Le *NeuN* (Neuronal Nuclear) ou la *NSE* (NeuronSpecificEnolase) sont exprimés spécifiquement dans les neurones matures. Enfin, la *GFAP* (Glial Fibrillary Acid Protein), le *S100* ou le *CNP* (2':3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase) constituent des marqueurs astrocytaires.

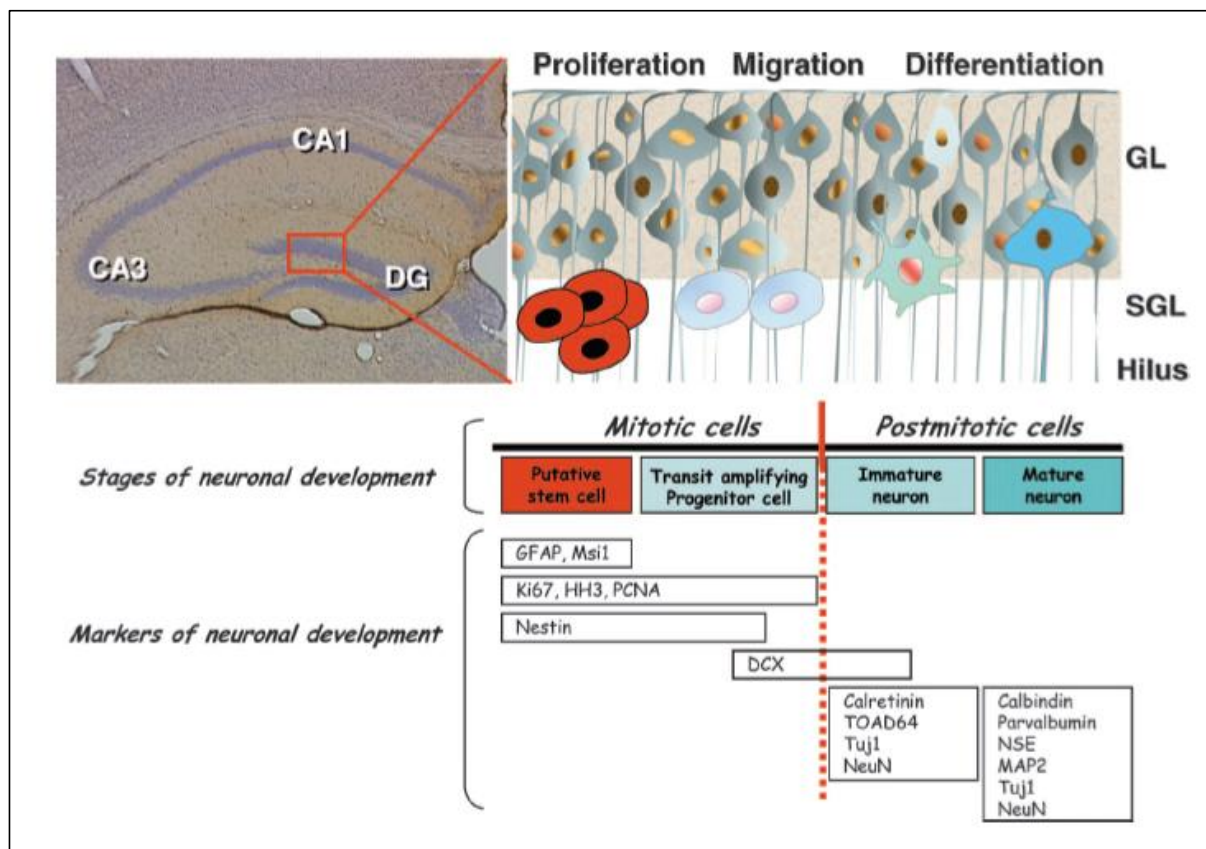


Figure 17 : La neurogène hippocampique.

Source : Abrous et al., (2005)

Neurogène et mémoire

De la même manière que pour la plasticité synaptique, il est aujourd'hui admis que la production de nouveaux neurones granulaires chez l'adulte représente une nouvelle forme de plasticité cérébrale pouvant sous-tendre certaines fonctions mnésiques (Schinder and Gage, 2004; Snyder et al., 2005; Aimone et al., 2006; Leuner et al., 2006; Kitabatake et al., 2007; Drapeau and Nora Abrous, 2008; Deng et al., 2010). En s'intégrant dans le réseau pré-existant, les neurones nouvellement formés contribueraient aux processus de mémorisation hippocampo-dépendants (Dobrossy et al., 2003; Dupret et al., 2008). En effet, ces nouveaux neurones, bien qu'en faible nombre, présentent des propriétés électrophysiologiques propres permettant une l'induction de la PLT (Schmidt-Hieber et al., 2004; Overstreet-Wadiche and Westbrook, 2006). Cependant, il faut plusieurs mois pour qu'ils acquièrent une morphologie identique aux cellules granulaires déjà présentes et qu'ils soient intégrés de façon fonctionnelle dans le circuit hippocampique (Ramirez-Amaya et al., 2006; Zhao et al., 2006).

Une relation de réciprocité existe entre la neurogenèse et la mémoire. Ainsi, de nombreux travaux suggèrent qu'une amélioration des performances dans des tâches dépendantes de l'hippocampe résulterait d'une augmentation de la neurogenèse hippocampique. En effet, les études sur des animaux élevés en environnement enrichi présentent une amélioration de la neurogenèse hippocampique associée à de meilleures performances mnésiques en labyrinthe aquatique de Morris (Kempermann et al., 1997, 1998; Nilsson et al., 1999). D'autre part, plusieurs travaux dans lesquels la neurogenèse a été induite ou inhibée ont montré que les nouveaux neurones adultes hippocampiques sont nécessaires dans différentes tâches de mémoire spatiale hippocampo-dépendante (Clelland et al., 2009; Trouche et al., 2009; Goodman et al., 2010; Nakashiba et al., 2012). Ces données montrent également que les nouveaux neurones sont préférentiellement recrutés dans les réseaux hippocampiques codant les informations spatiales et contextuelles, exerçant ainsi un rôle critique dans les processus mnésiques.

Par ailleurs, l'apprentissage spatial semble lui aussi capable d'influencer la neurogenèse mais les résultats restent encore assez controversés. Alors que certains auteurs montrent une augmentation de la prolifération cellulaire après une épreuve de mémoire spatiale de référence dans le labyrinthe aquatique de Morris (Lemaire et al., 2000; Dobrossy et al., 2003), d'autres montrent une diminution (Namestkova et al., 2005) ou une absence d'effet (Mohapel et al., 2006). De plus, il semblerait que la mémoire spatiale de travail quant à elle, entraîne une diminution du niveau de prolifération cellulaire (Mohapel et al., 2006). Le type de mémoire testé semble donc moduler différemment le niveau de neurogenèse. Concernant la survie cellulaire, certains auteurs rapportent que l'apprentissage la stimule (Gould et al., 1999; Ambrogini et al., 2000; Leuner et al., 2004), ou au contraire la diminue (Dobrossy et al., 2003; Ambrogini et al., 2004) ou reste sans effet (Van der Borght et al., 2005). Enfin récemment, il a été mis en évidence que le niveau de difficulté du protocole utilisé en piscine de Morris (nombre d'essais par session, nombre d'indices) avait un impact sur les modifications du niveau de survie cellulaire. Les auteurs ont ainsi montré qu'un niveau de difficulté faible induisait une augmentation de survie cellulaire, tandis qu'un niveau de difficulté élevé provoquait une diminution de ces mêmes cellules (Epp et al., 2010).

III.1.4. Altérations de plasticité cérébrale associées aux déficits mnésiques au cours du vieillissement

Le vieillissement du cerveau se manifeste à plusieurs niveaux :

- *Au niveau systémique*, il se caractérise par une diminution des facultés d'adaptation, une baisse des capacités d'apprentissage et de mémoire, des états dépressifs, un ralentissement psychomoteur... (Erickson and Barnes, 2003).

- *Au niveau anatomique*, il se manifeste par une perte neuronale, une atrophie cérébrale et une dilatation ventriculaire.

- *Au niveau cellulaire*, il a été observé une diminution de la densité de certains récepteurs tels que les récepteurs glutamatergiques NMDA et AMPA (Dickstein et al., 2007), une diminution de la libération des neurotransmetteurs, une démyélinisation des fibres nerveuses et une diminution de la longueur et du nombre d'épines dendritiques.

III.1.4.1. Plasticité synaptique au cours du vieillissement

Les études menées chez l'Homme comme chez l'animal suggèrent que le vieillissement cérébral s'accompagne d'une réorganisation neuronale principalement dans le cortex préfrontal et la région hippocampique (Burke and Barnes, 2006). Ainsi, il a été montré que le vieillissement entraîne des déficits de PLT, corrélés avec des déficits mnésiques observés dans des tâches évaluant la mémoire spatiale (Rosenzweig and Barnes, 2003).

Certaines études ont montré que des changements structuraux au niveau de l'hippocampe impliquant des pertes synaptiques associés à des modifications de concentration de certains marqueurs synaptiques, sont à l'origine des altérations de plasticité synaptique observées au cours du vieillissement et contribuent à l'apparition des déficits de PLT et des déficits cognitifs (Selkoe, 2002; Salehi et al., 2003; Coleman, 2005; Burke and Barnes, 2006, 2010). En effet, une diminution d'environ 30% du nombre de synapses chez des rats âgés a été observée dans le gyrus dentelé, de manière concomitante à une baisse des performances en mémoire spatiale (Bondareff and Geinisman, 1976; Geinisman et al., 1977; Geinisman et al., 1986; Geinisman et al., 1992). De plus, une diminution du nombre d'épines dendritiques et de

leur longueur a été observée dans les neurones du gyrus dentelé, associée à des déficits cognitifs hippocampo-dépendants (von Bohlen Und Halbach, 2007).

Par ailleurs, il a été montré dans les neurones d'animaux âgés une augmentation de la conductance du Ca^{2+} conduisant à des modifications de l'homéostasie calcique et par conséquent à des altérations de plasticité synaptique (Landfield, 1988; Thibault and Landfield, 1996; Foster and Norris, 1997; Rosenzweig and Barnes, 2003; Toescu et al., 2004).

D'autre part, certaines protéines synaptiques ont été particulièrement étudiées chez l'animal âgé, telles que les récepteurs NMDA impliqués dans les processus de PLT (Magnusson et al., 2007; Topic et al., 2007), mais également la synaptophysine, la neurogranine (RC3) ou encore la neuromoduline (GAP-43). Ainsi une diminution d'expression de RC3 et GAP-43 a été observée au cours du vieillissement (Casoli et al., 2001; Etchamendy et al., 2001; Feart et al., 2005a; Boucheron et al., 2006) ; cette diminution de RC3 étant associée à des déficits de PLT et de mémoire spatiale (Etchamendy et al., 2001).

Enfin, l'excitabilité neuronale et la transmission synaptique lors de tâches comportementales hippocampo-dépendantes apparaissent altérées au cours du vieillissement. Ces déficits concernent à la fois les voies glutamatergiques et cholinergiques qui représentent les principaux systèmes excitateurs dans la communication neuronale hippocampique. Il a ainsi été démontré que les animaux âgés présentent des déficits mnésiques concomitants à une dégénérescence des neurones cholinergiques et une perturbation de la voie de signalisation du Nerve Growth Factor (NGF), impliquée dans la survie de ces neurones (Williams et al., 2006).

III.1.4.2. Neurogenèse au cours du vieillissement

Bien que la neurogenèse hippocampique persiste au cours du vieillissement, une diminution importante de la production de nouveaux neurones a été mise en évidence dans le GD d'animaux âgés (Abrous et al., 2005). Par conséquent, le déclin de neurogenèse observé chez les animaux âgés pourrait participer au déclin des fonctions cognitives. Cependant, la relation potentielle entre certaines étapes de la neurogenèse et les performances mnésiques des animaux âgés reste à préciser. Toutefois, une diminution de neurogenèse hippocampique a été associée à des déficits cognitifs lors d'une épreuve spatiale dans le labyrinthe aquatique de Morris au cours du vieillissement (Kempermann et al., 1998; Driscoll et al., 2006). De plus, il a été montré que la neurogenèse était altérée dans des modèles de vieillissement pathologique tels que le stress prénatal qui accélère l'apparition des déficits cognitifs au cours du

vieillessement (Vallee et al., 1999) et diminue la neurogenèse hippocampique (Lemaire et al., 2000).

Enfin, d'autres travaux plus récents suggèrent l'existence d'une relation quantitative entre le nombre de neurones nouvellement formés et les performances spatiales au cours du vieillissement. Ainsi, les animaux âgés qui présentent de bonnes performances dans le labyrinthe aquatique sont également ceux dont le nombre de neurones néo-formés est le plus important (Drapeau et al., 2003). Ces données restent toutefois controversées puisque, d'autres études ne révèlent aucun lien entre neurogenèse et capacités mnésiques au cours du vieillissement (Bizon and Gallagher, 2003; Merrill et al., 2003), ou indiquent même des corrélations négatives entre le niveau de survie cellulaire et les capacités mnésiques des animaux âgés (Bizon et al., 2004). Par conséquent, le lien précis existant entre les processus de neurogenèse et les performances mnésiques chez le sujet âgé reste encore à élucider.

L'identification de facteurs susceptibles de stimuler la neurogenèse chez le sujet âgé dans le but d'améliorer leurs performances mnésiques, a fait l'objet d'un certain nombre d'études. Ainsi, l'influence d'un environnement enrichi a été étudiée par Kempermann et al., (1998) et il en ressort qu'une amélioration des capacités mnésiques accompagnée d'une augmentation de la différenciation neuronale a été observée chez le sujet âgé après une exposition de 2 mois dans un milieu enrichi. D'autre part, certains facteurs neurobiologiques sont également susceptibles de moduler ces processus de neurogenèse. En effet, le BDNF semble capable de stimuler la différenciation neuronale dans l'hippocampe de rats adultes (Scharfman et al., 2005). Or, au cours du vieillissement, il a été observé une diminution d'expression du BDNF concomitante à celle des récepteurs TrkB sur lesquels ces facteurs vont se fixer afin de contribuer à la transduction des signaux intracellulaires (Silhol et al., 2005). Enfin, une corrélation a été mise en évidence entre le niveau d'expression du BDNF et les performances mnésiques du sujet âgé (Schaaf et al., 2001).

Ces données suggèrent que des altérations de neurogenèse hippocampique pourraient contribuer à certains déficits cognitifs liés au vieillissement. C'est pourquoi, il est envisageable qu'une intervention via certains facteurs neurobiologiques impliqués dans les processus de neurogenèse, permettrait de compenser ces déficits. La voie de signalisation des rétinoïdes étant capable de moduler l'expression de certains de ces facteurs comme par exemple les récepteurs des facteurs de croissance (Bonnet et al., 2008), il reste à déterminer si

son action sur l'amélioration des capacités mnésiques du sujet âgé met en œuvre ces mécanismes.

III.2. Implication des voies de signalisation de la vitamine A et des glucocorticoïdes dans les processus mnésiques au cours du vieillissement

Les altérations de plasticité synaptique et de neurogenèse observées au niveau hippocampique au cours du vieillissement, contribueraient à l'apparition des déficits cognitifs. Parmi les facteurs pouvant influencer les processus de plasticité hippocampiques figurent le stress et les glucocorticoïdes, connus en particulier pour influencer négativement la neurogenèse hippocampique (Gould, 1994; Dranovsky and Hen, 2006). D'autre part, quelques études montrent en parallèle que la stimulation de la voie de signalisation de la vitamine A au cours du vieillissement permettait de corriger ces altérations de plasticité et d'améliorer les capacités mnésiques chez le sujet âgé (Etchamendy et al., 2001; Mingaud et al., 2008; Touyarot et al., 2013).

III.2.1. Hyperactivation de la voie de signalisation des glucocorticoïdes et altérations des processus mnésiques au cours du vieillissement

III.2.1.1. Hyperactivation de l'axe HPA et conséquences fonctionnelles

Une des fonctions importantes des glucocorticoïdes au niveau cérébral constitue la régulation de l'activité de l'axe HPA via leurs propres récepteurs (GR et MR) fortement exprimés au niveau de l'hippocampe, l'hypothalamus et le cortex préfrontal (Ulrich-Lai and Herman, 2009). Comme décrit dans le chapitre I, un stress prolongé induit une activation de l'axe corticotrope conduisant à la libération de CRH (corticotropin-releasing hormone) par l'hypothalamus, d'ACTH (adrénocorticotropine) par l'hypophyse stimulant la libération des glucocorticoïdes par la glande corticosurrénale. Ces glucocorticoïdes sont capables d'agir au niveau du système nerveux central et en particulier au niveau des structures du système limbique afin de réguler cet axe. Ainsi, l'hippocampe associé à d'autres structures exerce alors un rétrocontrôle négatif qui résulte en une réduction de la concentration en GC dans le sang. Lorsque le stress se prolonge anormalement ou survient de manière trop fréquente ou excessive, l'activation soutenue de l'axe HPA peut engendrer des altérations importantes.

Au cours du vieillissement le rétrocontrôle négatif de l'axe HPA serait fortement atténué (Boscaro et al., 1998; Bizon et al., 2001; Arfaoui et al., 2009) ce qui conduirait à une hypersécrétion des glucocorticoïdes pendant les périodes d'exposition au stress (Sapolsky, 1982; Born et al., 1995). L'hypothèse de la cascade glucocorticoïdes, établissant un lien entre l'axe HPA et les altérations hippocampiques a donc été suggérée par Sapolsky et al. en 1986. En effet, les altérations du contrôle de l'axe corticotrope observées au cours du vieillissement conduirait à une élévation prolongée des glucocorticoïdes qui aurait des conséquences néfastes au niveau hippocampique (*Figure 18*). Parmi celles-ci, une diminution d'expression des récepteurs des glucocorticoïdes a pu être observée chez l'animal âgé dans l'hippocampe mais également dans d'autres structures cérébrales (Bizon et al., 2001; Mizoguchi et al., 2009; Lee et al., 2012). Ce phénomène potentialiserait les effets délétères sur l'hippocampe en maintenant une hypersécrétion de glucocorticoïdes.

Cette hypothèse est d'autant plus probante qu'il a été mis en évidence des corrélations entre hyperactivation de l'axe HPA, altération de l'expression hippocampique des GR et développement de troubles émotionnels et mnésiques (Issa et al., 1990; Bizon et al., 2001; Lee et al., 2012; Harris et al., 2013).

D'autre part, d'autres études suggèrent que les conséquences néfastes d'une hypersécrétion des glucocorticoïdes sur les fonctions hippocampiques proviendraient d'altérations de plasticité synaptique et/ou de neurogenèse hippocampique. En effet, les glucocorticoïdes sont susceptibles d'inhiber la neurogenèse hippocampique (Cameron and Gould, 1994) et de perturber, entre autre, la plasticité synaptique dans l'hippocampe et le cortex préfrontal (Kim and Diamond, 2002; Cerqueira et al., 2007). En particulier, la neurogenèse hippocampique semble être une cible neurobiologique privilégiée du stress et des glucocorticoïdes (Gould, 1994; Gould et al., 1998; Czeh et al., 2001; Fuchs et al., 2001; Tanapat et al., 2001; Pham et al., 2003; Dranovsky and Hen, 2006). Ainsi, il a été démontré que la corticostérone inhibe la neurogenèse chez les rats jeunes et les rats âgés (Lemaire et al., 1999) et qu'une surrénalectomie réalisée en milieu de vie (12 mois) améliore les fonctions cognitives et stimule la neurogenèse chez les animaux âgés de 24 mois (Montaron et al., 2003). De plus, il semblerait que la suppression de la neurogenèse hippocampique induite par un modèle de souris transgéniques entraîne une hyperactivité de l'axe HPA renforçant les données en faveur de l'existence d'une boucle physiopathologique glucocorticoïde-neurogenèse-hippocampe-mémoire (Schloesser et al., 2009).

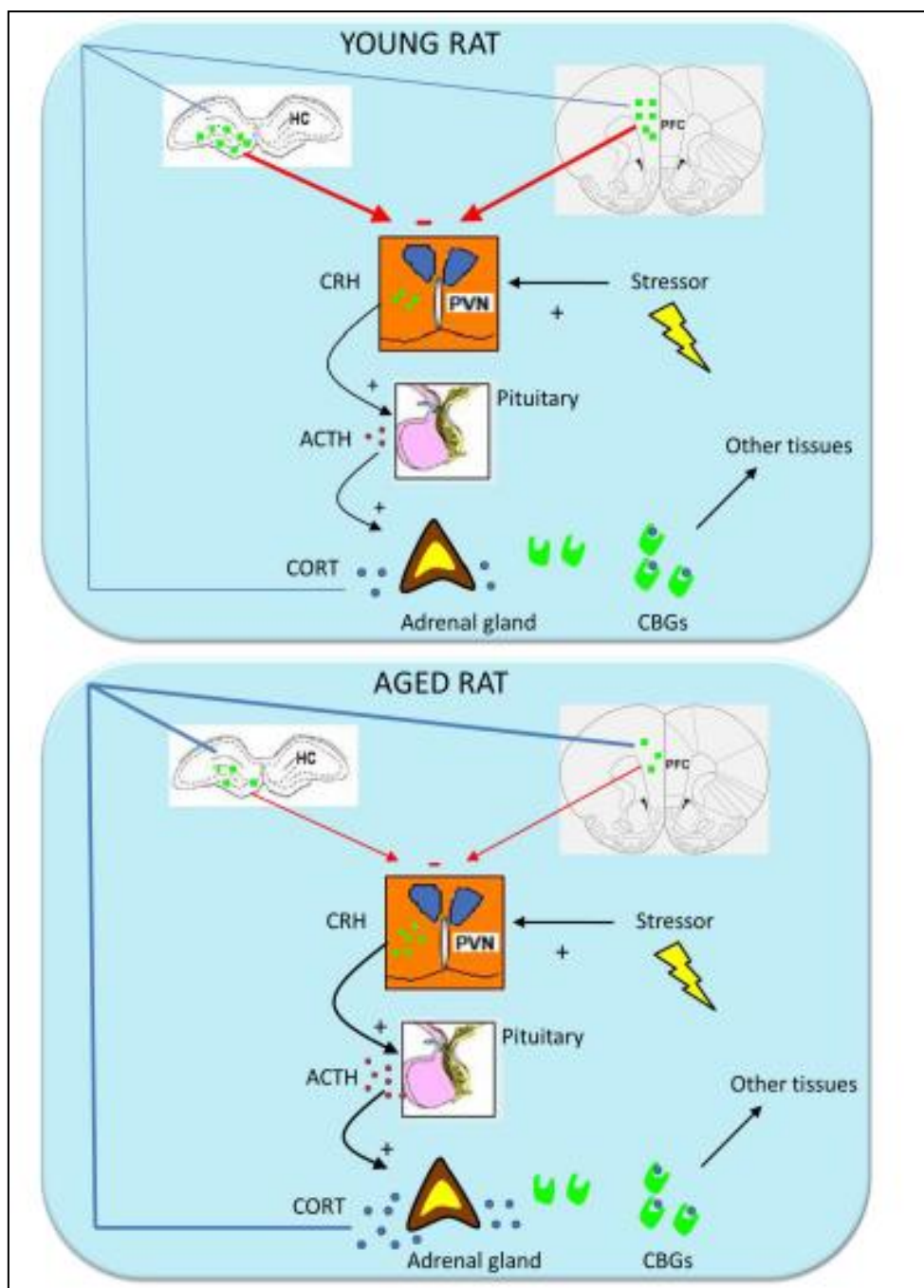


Figure 18 : Modèle de fonctionnement de l'axe HPA chez le rat jeune et âgé.

Source : Garrido, (2011)

La présence de facteurs de stress va être à l'origine d'une hyperactivation de l'axe HPA aboutissant à une production et une libération de corticostérone importante. Chez l'animal jeune (en haut), la fixation de corticostérone sur les GR des centres supérieurs va alors inhiber l'activité de l'axe et ainsi diminuer la production de corticostérone. Chez l'animal âgé (en bas), la quantité de GR étant moins élevée, le rétrocontrôle négatif de l'axe va être moins efficace. Il en résulte une production et une libération excessive de corticostérone qui va endommager encore plus les structures impliquées dans le rétrocontrôle.

III.2.1.2. Hyperactivation de la 11 β -HSD1 et conséquences fonctionnelles

Comme nous venons de le voir précédemment, il a été suggéré qu'un dysfonctionnement de l'axe corticotrope se traduisant par une hypersécrétion des glucocorticoïdes plasmatiques soit en partie à l'origine d'une hyperactivité de la voie des glucocorticoïdes au niveau cérébral.

Par ailleurs, d'autres données ont montré un rôle tout aussi important de l'enzyme 11 β -HSD1 (11 β -HydroxySteroid Dehydrogenase type 1) dans l'hyperactivité des glucocorticoïdes observée au cours du vieillissement. En effet, une surexpression de la 11 β -HSD1, (responsable de la conversion intracellulaire de la 11-dehydroxycorticostérone inactive en corticostérone active) a été observée dans l'hippocampe et le cortex pariétal d'animaux âgés et corrélant à des déficits de mémoire hippocampo-dépendants (Holmes et al., 2010; Yau and Seckl, 2012). Par ailleurs, de nombreuses études ont montré que son inhibition par invalidation du gène améliore la mémoire spatiale, diminue les niveaux de corticostérone intrahippocampique et augmente les processus de potentialisation à long terme chez les souris âgées (Yau et al., 2001; Yau et al., 2007). De plus, l'injection d'un inhibiteur de la 11 β -HSD1 améliore, au même titre que l'invalidation du gène, les performances mnésiques du sujet âgé dans une tâche hippocampo-dépendante (Sooy et al., 2010).

Des travaux intéressants réalisés par l'équipe du Dr D.Béracochéa ont permis de mettre en évidence une corrélation entre des niveaux élevés de glucocorticoïdes intra-hippocampiques et les processus de mémoire dépendants de l'hippocampe dans le test du CSD (Contextual Serial Discrimination task) permettant la détection précoce des déficits mnésiques liés au vieillissement (Celerier et al., 2004; Beracochea et al., 2008a; Beracochea et al., 2008b; Chauveau et al., 2009b; Chauveau et al., 2009a; Pierard et al., 2009). Ainsi, il a été montré que la capacité des souris à mémoriser correctement cette tâche hippocampo-dépendante était corrélée négativement à la concentration intra-hippocampique en corticostérone (Chauveau et al., 2010; Tronche et al., 2010).

En résumé, la concentration intracérébrale en glucocorticoïdes va être dépendante à la fois de la libération des glucocorticoïdes dans le plasma, mais également de la conversion intracellulaire des glucocorticoïdes inactifs vers leur forme active via la 11 β -HSD1 (Yau and Seckl, 2012).

III.2.2. Effet du statut en vitamine A sur les processus mnésiques

L'un des objectifs de recherche du laboratoire est de mieux comprendre l'implication de la voie de signalisation de la vitamine A dans les processus neurobiologiques qui soutiennent les fonctions cognitives dans le cerveau adulte. Ainsi, les études sont principalement menées au cours du vieillissement et au cours d'une carence en vitamine A, modèle nutritionnel permettant la manipulation physiologique du niveau d'activité de la voie de signalisation de l'AR (Etchamendy et al., 2003b; Husson et al., 2003).

III.2.2.1. Altérations du métabolisme de la vitamine A au cours du vieillissement

Au cours du vieillissement, le métabolisme de la vitamine A est fortement perturbé, il apparait que le stockage de la vitamine A soit important dans le foie (McLaren et al., 1979; Sundboom and Olson, 1984; van der Loo et al., 2004) mais que, en revanche, les capacités de la personne âgée à les mobiliser soient faibles (Azais-Braesco et al., 1995). L'augmentation des concentrations hépatiques serait à l'origine de la mise en place de mécanismes physiologiques compensateurs (Hollander and Dadufalza, 1990) qui expliqueraient notamment la hausse du rétinol sérique observée, chez les personnes âgées, après un repas (Borel et al., 1998).

Cependant, les données sur les concentrations en rétinol sérique sont très controversées. Si pour certains auteurs il n'y aurait que peu de variations avec l'âge (Dawson et al., 2000; Feart et al., 2005b) pour d'autres ils seraient diminués (van der Loo et al., 2004; Touyarot et al., 2013) ou encore augmentés (Hercberg et al., 1994; Borel et al., 1998). Par ailleurs, l'activité hépatique de l'ARAT (enzyme responsable de l'estérification du rétinol en rétinyl esters) augmente avec l'âge et à l'inverse, l'activité de la REH (enzyme responsable de l'hydrolyse des rétinyl esters en rétinol) diminue (Mobarhan et al., 1991). Il en est de même pour l'expression de la CRBP et des cytochromes P450 qui diminue avec l'âge (Dawson et al., 2000; Yamamoto et al., 2000). De plus, le transport post-prandial de la vitamine A des intestins vers le foie est retardé (Borel et al., 1998).

Les troubles métaboliques associés au vieillissement se traduiraient par une réduction de la biodisponibilité en AR entraînant une baisse du niveau d'activité de sa voie de signalisation. Ainsi, il a été observé une baisse de l'expression de certains récepteurs

nucléaires à l'acide rétinoïque (RAR et RXR) dans le foie (Pallet et al., 1997) et le cerveau d'animaux âgés (Enderlin et al., 1997a; Enderlin et al., 1997b; Etchamendy et al., 2001; Feart et al., 2005a) et plus particulièrement dans l'hippocampe (Etchamendy et al., 2001). L'administration d'AR permet de normaliser l'expression des récepteurs nucléaires (Enderlin et al., 1997b; Etchamendy et al., 2001; Feart et al., 2005a). Cet effet est spécifique de l'injection d'AR car il est bloqué par la co-administration d'un antagoniste (Etchamendy et al., 2001). Chez l'homme, il a également été montré une diminution de l'expression des RAR γ dans les PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cell) (Feart et al., 2005b). Par ailleurs, l'expression hippocampique de gènes cibles de l'AR impliqués dans la signalisation intracellulaire de l'AR tel que CRABP1 (transporteur intracellulaire de l'AR) est également perturbée : il a été montré une surexpression de CRABP1 hippocampique chez l'animal âgé entraînant des perturbations de disponibilité de l'AR intracellulaire et donc de son activité biologique (Touyarot et al., 2013). Ces altérations d'expression génique liées à l'âge apparaissent corrigées par un traitement à l'AR ou une supplémentation en vitamine A (Feart et al., 2005a; Touyarot et al., 2013).

III.2.2.2. Altérations du métabolisme de la vitamine A au cours d'une carence en vitamine A

Afin de mieux comprendre le lien entre l'hypoexpression de la voie d'action des rétinoïdes et les troubles mnésiques, l'étude des conséquences fonctionnelles d'une diminution physiologique de la biodisponibilité en vitamine A s'est avérée nécessaire. Un modèle nutritionnel de carence en vitamine A, permettant la manipulation physiologique du niveau d'activité de la voie de signalisation de l'AR a été développé au laboratoire (Etchamendy et al., 2003b; Husson et al., 2003).

La mise en place de ce modèle consiste à fournir aux animaux un régime dépourvu en vitamine A juste après la période de sevrage. Chez la souris, les dosages de rétinol sérique montrent que la carence vitaminique A s'établit après 31 semaines de régime carencé. La baisse d'activité de la voie de signalisation de l'AR, se caractérise par une diminution du taux des ARNm codant pour les récepteurs RAR et RXR. Dans ces conditions, une administration d'AR (150 μ g/kg/jour) pendant 4 jours aux animaux carencés ne s'accompagne d'aucun effet significatif sur l'activité de la voie d'action de l'AR. En revanche ce même traitement appliqué pendant 28 jours restaure l'expression des RAR (Etchamendy et al., 2003b). Chez le

rat, les diminutions d'expression des récepteurs RAR et RXR dans le striatum observées après 10 semaines de régime attestent du début de l'état de carence des animaux. D'autres données récentes de la littérature ont confirmé ces variations d'expressions tissulaires des récepteurs à l'acide rétinoïque dans des conditions de carence en vitamine A (Feng et al., 2012; Arfaoui et al., 2013).

III.2.2.3. Conséquences d'une hypoactivité de la voie de signalisation de la vitamine A sur la plasticité synaptique et les processus mnésiques

L'existence d'un lien entre rétinoïdes et processus de plasticité synaptique a été mise en évidence par l'utilisation de différents modèles animaux conduisant à une hypoactivité de la voie des rétinoïdes. En effet, des altérations de plasticité chez des animaux "knock out" pour les récepteurs RAR β et RXR γ ou RAR β seul ont été mises en évidence (Chiang et al., 1998). Chez des souris soumises à une carence en vitamine A pendant 12 semaines, des altérations de PLT sont également observées. Ces phénomènes sont réversés par la prise d'une alimentation supplémentée en vitamine A (Misner et al., 2001). Enfin des travaux réalisés chez la souris âgée, rapportent qu'une baisse de l'amplitude de la PLT, induite dans le champ CA1 de l'hippocampe après une stimulation téτανique de la voie commissurale, pouvait être partiellement compensée par un traitement par l'AR (Etchamendy et al., 2001).

Le fait marquant des recherches sur la vitamine A a été la découverte de l'implication de l'hypoactivité de la voie de signalisation des rétinoïdes dans l'étiologie du déclin cognitif associé au vieillissement (Etchamendy et al., 2001). En effet, il a été montré que le rétablissement par l'acide rétinoïque (traitement chronique) d'un fonctionnement normal de cette voie de signalisation, chez l'animal âgé, supprime de façon très sélective des déficits de mémoire relationnelle. La diminution d'expression de certains gènes régulés par les rétinoïdes et impliqués dans la plasticité synaptique pouvait donc expliquer en partie les altérations de plasticité qui sous-tendent les déficits mnésiques associés au vieillissement. Ainsi, dans ces travaux, l'hypo-expression des récepteurs nucléaires des rétinoïdes s'accompagne d'une baisse d'expression de RC3 et GAP43 (ARNm et protéines) (Etchamendy et al., 2001; Feart et al., 2005a). De plus, la stimulation du métabolisme de la vitamine A et par voie de conséquence la synthèse d'acide rétinoïque par une supplémentation nutritionnelle en vitamine A prévient ces altérations de plasticité synaptique et de mémoire lié à l'âge (Mingaud et al., 2008).

Par ailleurs, le modèle nutritionnel de carence en vitamine A, a permis d'étudier de manière approfondie et spécifiquement, les conséquences d'une hypoactivation dirigée de la voie de signalisation de la vitamine A et entraîne, chez l'animal adulte, des déficits cognitifs comparables à ceux liés au vieillissement (Etchamendy et al., 2003b). Une diminution de l'expression de RC3 a été observée dans le cerveau entier d'animaux carencés en vitamine A (Etchamendy et al., 2003b; Husson et al., 2003). De plus, chez des souris carencées en vitamine A, l'hypoexpression de la voie de signalisation des rétinoïdes s'accompagne d'une baisse d'expression de RC3 au niveau de l'hippocampe concomitante à des déficits de mémoire relationnelle. En revanche, le même traitement à l'AR n'a pas permis de normaliser le niveau d'expression de RC3 dans l'hippocampe et de supprimer les déficits cognitifs observés (Etchamendy et al., 2003b).

En conclusion, ces données bibliographiques plaident en faveur de l'hypothèse selon laquelle l'AR joue un rôle important dans les processus cognitifs en modulant certains aspects de la plasticité cérébrale au niveau de l'hippocampe parmi lesquels figure la plasticité synaptique. D'autre part, il existe au niveau de l'hippocampe une nouvelle forme de plasticité récemment découverte, la neurogenèse qui pourrait également être une cible neurobiologique des rétinoïdes.

III.2.2.4. Conséquences d'une hypoactivité de la voie de signalisation de la vitamine A sur la neurogenèse et les processus mnésiques

Les nutriments ne sont pas traditionnellement considérés comme des facteurs trophiques, cependant des évidences grandissantes suggèrent que certains pourraient influencer les processus de neurogenèse, donc avoir le potentiel de facteurs neurotrophiques (Malik et al., 2000). Parmi les facteurs susceptibles de moduler les processus de neurogenèse figure la vitamine A.

A l'heure actuelle, il est clairement établi que la vitamine A et ses dérivés jouent un rôle clé dans le développement du SNC. L'AR agit sur la différenciation neuronale au cours du développement, la croissance neuritique ainsi que sur la mise en place de l'axe antéropostérieur du tube neural (Corcoran and Maden, 1999; McCaffery and Drager, 2000; Maden, 2002; McCaffery et al., 2003). L'AR influence aussi le développement embryonnaire de certaines structures cérébrales telles que le striatum ou le bulbe olfactif (Valdenaire et al., 1998; Toresson et al., 1999). Parmi les gènes cibles des rétinoïdes figurent des gènes codant

pour des protéines impliquées dans les processus de neurogenèse telles que les facteurs de croissance, NGF et BDNF, et leurs récepteurs respectifs le TrkA et le TrkB (Scheibe and Wagner, 1992). En effet, plusieurs études *in vitro* réalisées sur des cultures de neurones ont démontré que l'AR intervenait dans les processus de neurogenèse (Wohl and Weiss, 1998; Takahashi et al., 1999; Wang et al., 2005). Il a ainsi été montré que l'AR favorisait la formation et la croissance des dendrites (Wu et al., 1998; Corcoran and Maden, 1999). Un traitement des cellules souches hippocampiques de rats par l'AR, induit leur différenciation en neurones et s'accompagne d'une augmentation de l'expression de récepteurs aux neurotrophines tels que Trk A et Trk B (Takahashi et al., 1999), neurotrophines qui induisent la croissance neuritique de cellules hippocampiques (Labelle and Leclerc, 2000). Enfin, un traitement de cellules progénitrices neurales par l'AR induit leur différenciation en trois types différents de cellules nerveuses (astrocytes, oligodendrocytes ou motoneurones), l'activation de certains récepteurs nucléaires de l'AR se faisant de façon séquentielle pour aboutir au phénotype final (Goncalves et al., 2005).

A ce jour, les données de la littérature relatives au rôle de l'AR dans les processus de neurogenèse chez l'adulte restent peu nombreuses et souvent contradictoires. Certaines études pharmacologiques établissent un lien entre les voies d'action des rétinoïdes, les processus de neurogenèse et les fonctions cognitives. Des travaux ont ainsi montré qu'un traitement par l'AR 13-*cis* (isomère de l'AR tout-*trans*) à de fortes doses (1mg/kg/jour) pendant trois semaines chez la souris, induit une diminution de neurogenèse hippocampique (Crandall et al., 2004; Sakai et al., 2004). Ces altérations de neurogenèse sont associées à l'apparition de déficits cognitifs chez les animaux traités (Crandall et al., 2004). Suite à ces études pharmacologiques, ces derniers auteurs ont émis l'hypothèse selon laquelle les effets de l'AR à des doses très élevées pourraient contribuer aux troubles de la dépression observés chez certains patients traités par l'AccutaneTM.

Plus récemment, quelques études se sont intéressées aux effets d'une hypoactivité de la voie des rétinoïdes sur les processus de neurogenèse chez l'adulte en utilisant la carence en vitamine A comme approche nutritionnelle. Ainsi, une augmentation de la prolifération et une diminution de la différenciation ont été observées dans le bulbe olfactif (Asson-Batres et al., 2003). Au niveau hippocampique, une carence en vitamine A entraîne une diminution de la survie et de la différenciation neuronale mais reste sans effet sur la prolifération cellulaire au niveau de l'hippocampe (Jacobs et al., 2006). De manière intéressante, nous avons montré par la suite que ces altérations de la neurogenèse hippocampique, concomitantes à des déficits mnésiques pouvaient être réversés. En effet, l'administration d'acide rétinoïque aux animaux

carencés normalise l'expression de TrkA, stimule la neurogenèse hippocampique et restaure les performances mnésiques des rats carencés en vitamine A (Bonnet et al., 2008).

Enfin, une étude réalisée chez le rat au cours du vieillissement et à laquelle j'ai participé (voir Partie II du manuscrit), a montré qu'une supplémentation en vitamine A pendant 4 mois débutée à mi-vie, permettait de corriger les déficits mnésiques liés à l'âge probablement en activant certains processus de neurogenèse tels que la survie et la différenciation neuronale (Touyarot et al., 2013).

Ainsi, l'induction d'une hypoactivité modérée de la voie d'action des rétinoides par une carence vitaminique A entraîne, chez l'animal adulte, un déficit mnésique similaire à celui observé chez la souris âgée. L'administration d'AR ou la supplémentation en vitamine A semble efficace pour corriger ces déficits dès lors qu'elle intervient avant l'apparition de troubles irréversibles.

Résumé

Dans ce chapitre, nous montrons que le déclin cognitif lié à l'âge se caractérise principalement par des altérations de la mémoire hippocampo-dépendante. Ces modifications dans les processus mnésiques ont été associées à une détérioration de la plasticité cérébrale hippocampique (potentialisation à long terme et neurogenèse), dont la régulation par l'activité des voies de signalisation des rétinoides et des glucocorticoïdes a été mise en évidence. Ainsi, la diminution de l'activité des rétinoides et l'augmentation de celle des glucocorticoïdes observées chez le sujet âgé auraient des conséquences néfastes sur la plasticité cérébrale hippocampique se traduisant au niveau fonctionnel par des altérations cognitives.

CHAPITRE IV. INTERACTIONS DES VOIES DE SIGNALISATION DE L'ACIDE RÉTINOÏQUE ET DES GLUCOCORTICOÏDES

L'ensemble des données suggère que des altérations de plasticité cérébrale pourraient contribuer à certains déficits cognitifs liés au vieillissement. C'est pourquoi, il est envisageable qu'une intervention via certains facteurs neurobiologiques impliqués dans les processus de plasticité, permettrait de compenser ces déficits. L'une des stratégies thérapeutiques visant à retarder le déclin cognitif chez le sujet âgé consisterait alors à manipuler le niveau de concentration de certains facteurs nutritionnels tels que la vitamine A qui permettrait de contrecarrer les effets délétères d'un excès de glucocorticoïdes et de corriger ces altérations neurobiologiques et cognitives.

A l'heure actuelle quelques études plaident en faveur d'interactions entre la voie de signalisation des rétinoïdes et la voie de signalisation des glucocorticoïdes. La littérature décrit principalement une action inhibitrice des rétinoïdes sur les glucocorticoïdes.

IV.1. Action des rétinoïdes sur la capacité de liaison des glucocorticoïdes

Certaines études ont montré l'implication des rétinoïdes dans l'inhibition des interactions entre les récepteurs des glucocorticoïdes et leur ligand. Ainsi sur des cultures cellulaires de lymphocytes T humains, l'ajout de rétinol induit une diminution de la liaison entre la dexaméthasone, un glucocorticoïde de synthèse, et le récepteur GR, bloquant ainsi son activité biologique (Lacroix et al., 1984). De manière similaire, l'AR réduit le nombre de sites de liaison aux glucocorticoïdes et ce de manière dose-dépendante dans des cellules cancéreuses épidermoïdes (Reiss et al., 1988). Enfin, chez des animaux carencés en vitamine A, la capacité de liaison des glucocorticoïdes avec les GR semble augmentée dans le foie (Audouin et al., 1992) et restaurée par une supplémentation en vitamine A ou des administrations d'AR (Audouin-Chevallier et al., 1993). Ces mêmes auteurs ont suggéré également qu'un traitement à l'AR chez des rats ayant un statut en vitamine A normal pouvait induire une dégradation protéolytique du récepteur GR (Audouin-Chevallier et al., 1995). Ainsi, ces résultats confortent l'hypothèse selon laquelle le statut en vitamine A modulerait l'activité de la voie des glucocorticoïdes.

IV.2. Action des rétinoïdes sur l'activité de l'axe HPA

Plus récemment l'impact d'un traitement par l'AR a été étudié sur la modulation de l'axe HPA. Ainsi, un excès de rétinoïdes conduirait à une hyperactivité de l'axe corticotrope qui pourrait être à l'origine des troubles comportementaux liés à l'anxiété. En effet, une administration chronique d'AR pendant 6 semaines et à de fortes doses (2mg/kg) induit une augmentation du niveau basal de corticostérone plasmatique, une augmentation d'expression de CRF (Corticotropin Releasing Factor) dans l'hypothalamus et une augmentation de la taille des surrénales indiquant un dysfonctionnement de l'axe corticotrope (Cai et al., 2010). Ces travaux suggèrent qu'un excès de rétinoïdes (administration chronique d'AR) conduirait à une altération de l'axe corticotrope. D'autres études ont montré au contraire l'action inhibitrice de l'AR sur l'activité de l'axe corticotrope. Ainsi, dans un modèle expérimental de syndrome de Cushing provoqué par une tumeur de l'hypophyse et conduisant à une libération excessive de GCs, l'AR inhibe la production d'ACTH par l'hypophyse rétablissant ainsi les niveaux de GCs libérés par les surrénales (Paez-Pereda et al., 2001). Ces résultats suggèrent qu'un traitement thérapeutique pourrait être préconisé chez des patients atteints de ce syndrome afin de limiter l'hypersecretion des glucocorticoïdes ainsi que le développement de troubles émotionnels et mnésiques associés (Starkman et al., 1992b; Starkman et al., 1992a; Starkman et al., 1999; Michaud et al., 2009).

IV.3. Action des rétinoïdes sur la 11 β -HSD1

Certaines études montrent également une action inhibitrice de la voie des rétinoïdes sur celle des GCs via une modulation de la transcription de la 11 β -HSD1 contrôlant le niveau de GCs intracellulaires. Ainsi, Aubry et Odermatt, 2009 ont montré qu'un traitement par l'AR des cellules C2C12 de myotubes inhibait la transcription de l'enzyme 11 β -HSD1, probablement via un récepteur RAR γ . Enfin, une étude réalisée sur un modèle de rats obèses révèle qu'une supplémentation en vitamine A induit une diminution de l'activité et de l'expression de cette enzyme au niveau hépatique (Sakamuri et al., 2011). De plus, notre équipe a montré récemment qu'une carence en vitamine A chez le rat LOU/C, souche de rats présentant des capacités mnésiques préservées au cours du vieillissement (Kollen et al., 2010), induisait une surexpression de la 11 β -HSD1 dans l'hippocampe et l'hypothalamus et une diminution des GR et MR dans l'hippocampe. Les concentrations en corticostérone

plasmatique de ces animaux carencés étaient également plus importantes en condition basale et 90min après un stress de contention. Toutes ces modifications physiologiques étaient corrigées par un traitement à l'acide rétinoïque (Arvy et al., 2013). De nombreuses études ayant montré que l'inhibition par invalidation du gène de cette enzyme améliore la mémoire spatiale chez la souris âgée (Yau et al., 2001; Yau et al., 2007), nous pouvons supposer que l'administration d'AR s'opposerait aux effets délétères des glucocorticoïdes causés par la suractivation de la 11 β -HSD1.

IV.4. Action des rétinoïdes sur certains gènes cibles des glucocorticoïdes

Alors que certains auteurs observent des effets synergiques (Toth et al. 2011), d'autres montrent des effets opposés sur l'expression de gènes communs aux deux voies de signalisation (Aubry and Odermatt, 2009; Brossaud et al., 2013). Plus précisément, l'application d'AR sur une lignée de cellules neuronales hippocampiques HT22, entraîne une diminution d'expression des récepteurs GR ainsi qu'une augmentation de la sécrétion de BDNF, neurotrophine intervenant dans les processus de plasticité synaptique et neurogenèse. La dexaméthasone aurait des effets opposés entraînant une réduction d'expression de BDNF et une diminution de sécrétion de BDNF dans les cellules HT22 (Brossaud et al., 2013). Ainsi, ces résultats suggèrent que les effets néfastes des glucocorticoïdes sur l'expression et la sécrétion de BDNF pourraient être contrecarrés par la stimulation de la voie de signalisation des rétinoïdes.

Résumé

Dans ce chapitre, nous montrons que plusieurs études plaident en faveur d'interactions entre la voie de signalisation des rétinoïdes et celle des glucocorticoïdes. Celles-ci suggèrent dans la plupart des cas une action inhibitrice des rétinoïdes sur l'activité des glucocorticoïdes. Ainsi, ces données ouvrent de nouvelles perspectives thérapeutiques prometteuses dans les cas d'hyperactivation de la voie de signalisation des glucocorticoïdes comme par exemple dans la maladie de Cushing, dans le cadre du stress chronique ou encore au cours du vieillissement.

OBJECTIFS

Il est maintenant bien établi que l'hypoexpression de la voie de signalisation des rétinoïdes survenant naturellement au cours du vieillissement participe à l'étiologie des déficits mnésiques hippocampiques observés au cours du vieillissement (Etchamendy et al., 2001; Mingaud et al., 2008; Touyarot et al., 2013).

D'autre part, plusieurs observations font état d'une hyperactivation de l'axe hypothalamo-hypophysaire (HPA) chez certains individus au cours du vieillissement (Born et al., 1995). Des études menées chez le rongeur confortent ces observations et montrent notamment une diminution du rétrocontrôle de l'axe HPA se traduisant par une augmentation des niveaux de glucocorticoïdes circulants (Cortisol chez l'homme et corticostérone chez le rongeur) (Issa et al., 1990; Boscaro et al., 1998; Bizon et al., 2001; Mizoguchi et al., 2009). Or, il a été montré qu'un excès de corticostérone pouvait avoir des conséquences néfastes sur les processus de la plasticité cérébrale hippocampique (Cameron and Gould, 1994; Gould and Tanapat, 1999; Montaron et al., 2006) sous-tendant les fonctions mnésiques dépendantes de l'intégrité de l'hippocampe. En effet, plusieurs études ont révélé des corrélations négatives entre les performances mnésiques et les niveaux de corticostérone plasmatiques (Yau et al., 1995; Yau and Seckl, 2012) et intrahippocampiques (Chauveau et al., 2010; Tronche et al., 2010).

Ainsi, la diminution de l'activité de la voie de signalisation des rétinoïdes et l'augmentation de l'activité des glucocorticoïdes, se manifestant de manière concomitante au cours du vieillissement, participeraient à l'étiologie du déclin cognitif lié à l'âge. De plus, quelques études font état d'interactions entre ces deux voies de signalisation *in vitro* comme *in vivo*, et montrent notamment une action inhibitrice des rétinoïdes sur l'activité des glucocorticoïdes (Paez-Pereda et al., 2001; Aubry and Odermatt, 2009; Arvy et al., 2013; Brossaud et al., 2013).

Dans ce contexte, notre hypothèse de travail suggère qu'une baisse d'activité de la vitamine A, survenant naturellement au cours du vieillissement ou induite par le modèle nutritionnel de carence en vitamine A, contribuerait à une augmentation de l'activité des glucocorticoïdes et affecterait les processus neurobiologiques et cognitifs. En revanche, une supplémentation en vitamine A permettrait de maintenir l'action inhibitrice de la voie de signalisation des rétinoïdes sur celle des glucocorticoïdes, s'opposant ainsi à leurs effets délétères sur les processus neurobiologiques et cognitifs.

Ce projet de thèse visait à répondre aux questions suivantes :

1. Quelles sont les conséquences d'une hypoactivité de la voie de signalisation de la vitamine A (induite par une carence ou survenant naturellement au cours du vieillissement) sur la voie d'action des glucocorticoïdes et son impact sur les troubles émotionnels et mnésiques ?

2. L'action bénéfique d'une supplémentation nutritionnelle en vitamine A ou d'un traitement par l'acide rétinoïque sur les capacités mnésiques et émotionnelles du sujet carencé en vitamine A ou âgé passe-t-elle au moins en partie par une action sur la voie de signalisation des glucocorticoïdes ?

Ainsi, nous avons étudié les effets d'une supplémentation nutritionnelle en vitamine A ou d'un traitement par l'acide rétinoïque sur l'activité des glucocorticoïdes et leurs impacts sur la plasticité cérébrale et les processus mnésiques et émotionnels :

- au cours d'une carence en vitamine A : Partie I.
- au cours du vieillissement : Partie II.

En parallèle, une étude visant à mettre au point le dosage de l'acide rétinoïque dans différents tissus a été réalisée et fait l'objet de la Partie III de ce manuscrit de thèse.

Partie I : Effet d'une carence et d'une supplémentation en vitamine A sur la voie d'activité des glucocorticoïdes et conséquences sur la neurogenèse hippocampique et les processus émotionnels et mnésiques.

Les résultats de cette première partie montrent des corrélations entre le niveau d'activité de la voie de signalisation des rétinoïdes et celle des glucocorticoïdes associées à des modifications comportementales, de neurogenèse et d'expression génique hippocampiques. Ils ont fait l'objet d'une publication dans *Frontiers in Behavioral Neuroscience*.

Publication 1: Vitamin A status regulates glucocorticoid activity in Wistar rats: consequences on cognitive functions and hippocampal neurogenesis?

Partie II : Effet d'une supplémentation en vitamine A ou d'un traitement par l'acide rétinoïque sur la voie d'activité des glucocorticoïdes et conséquences sur la plasticité synaptique et les processus mnésiques au cours du vieillissement.

Cette deuxième partie de thèse fait directement suite à un article que nous avons publié dans Plos One montrant qu'une supplémentation en vitamine A intervenant à mi-vie chez l'animal, s'avère efficace pour restaurer la neurogenèse et les capacités mnésiques hippocampiques.

Publication 2: A mid-life vitamin A supplementation prevents age-related spatial memory deficits and hippocampal neurogenesis alterations through CRABP-1.

En collaboration avec l'équipe du Dr D.Béracochéa (INCIA, Bordeaux), nous avons montré que la prévention des déficits mnésiques observés chez l'animal à mi-vie, passait au moins en partie par une action sur la voie de signalisation des glucocorticoïdes. Les résultats de cette deuxième étude ont fait l'objet d'une publication dans Frontiers in Aging Neuroscience.

Publication 3: Retinoic acid modulates intrahippocampal levels of corticosterone in middle-aged mice : consequences on hippocampal plasticity and contextual memory.

Partie III : Effet de l'apport alimentaire en vitamine A sur la synthèse d'acide rétinoïque dans les structures cérébrales : Mise au point du dosage de l'acide rétinoïque dans les tissus biologiques.

L'objectif de ce projet, mené en collaboration avec l'équipe du Dr JM.Schmitter (CBMN, Bordeaux), est de mettre au point le dosage de l'acide rétinoïque, par la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (CL-SM/SM) en utilisant le mode d'analyse Multiple Reaction Monitoring (MRM), dans les structures cérébrales et le sérum de rats soumis à différents apports en vitamine A ainsi que dans le sérum humain. Les résultats préliminaires de cette étude sont présentés dans la troisième partie de ce manuscrit de thèse.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

I. Animaux, régimes et traitements

I.1. Animaux

Les expériences ont été réalisées sur des rats mâles de la souche Wistar et des souris de la souche C57BL/6J provenant de l'élevage Janvier (France). Les animaux ont été placés dans des cages collectives dans une animalerie maintenue sous des conditions de température (22°C) et d'hygrométrie (60%) constantes avec un cycle lumière/obscurité de 12h/12h (8h00-20h00). Ils ont ensuite été isolés en cages individuelles une semaine avant le début des traitements et des tests comportementaux. Les animaux ont eu un accès libre à la nourriture et à l'eau de boisson. L'état physique ainsi que la croissance pondérale des animaux ont été suivis tout le long du protocole expérimental. Les protocoles ont été menés conformément aux recommandations de l'Union Européenne (86/609/EEC) et de la France (87/848). Ils ont été approuvés par le comité d'éthique de Bordeaux (N°50120169-A).

I.2. Séries expérimentales

I.2.1. Carence en vitamine A

Des rats mâles Wistar livrés au sevrage ont reçu un régime carencé en vitamine A (0 UI rétinol/g ; Laboratorio Piccionni, Italie) (n=40) ou un régime témoin (n=40) (5 UI rétinol/g ; INRA, Jouy-en-Josas, France) pendant 10 semaines. L'effet d'une carence en vitamine A de 10 semaines a été évalué sur la réactivité à la nouveauté. Quatre groupes expérimentaux ont ensuite été constitués et équilibrés en fonction de leur niveau d'activité locomotrice ainsi que de leur poids. La moitié des rats ayant reçu un régime carencé et des rats ayant reçu un régime témoin ont ensuite été supplémentés avec un régime enrichi en vitamine A (20 UI rétinol/g ; INRA, Jouy-en-Josas, France) durant 4 semaines. Les différents groupes ont ensuite été soumis aux différents tests comportementaux (Labyrinthe aquatique de Morris, Test de peur conditionnée au contexte, Labyrinthe en croix surélevé, Labyrinthe en Y...) avant d'être sacrifiés 24h après le dernier test. Plusieurs structures cérébrales (hippocampe, striatum..) ont été prélevées afin de réaliser les analyses de biologie moléculaire, de biochimie et d'immunohistochimie. Dans cette étude, nous présenterons les résultats obtenus uniquement à partir de l'hippocampe.

Effectifs des animaux :

- ☒ Groupe Contrôle (N=32)
- ☒ Groupe Contrôle supplémenté en vitamine A (N=32)
- ☒ Groupe Carencé (N=33)
- ☒ Groupe Carencé supplémenté en vitamine A (N=33)

1.2.2. Vieillesse

Deux groupes de souris mâles C57BL/6J âgées de 12 à 13 mois ont été constitués. Le premier a été soumis à un régime contrôle (5 UI rétinol/g ; INRA, Jouy-en-Josas, France) ou supplémenté en vitamine A (20 UI rétinol/g ; INRA, Jouy-en-Josas, France) pendant 2 mois. Le second a été uniquement nourri avec le régime contrôle (5 UI rétinol/g ; INRA, Jouy-en-Josas, France) durant 2 mois et a reçu des injections sous-cutanées d'AR ou de solvant 5 jours avant le début du test comportemental de mémoire (CSD, Contextual Serial Discrimination). Ce dernier interrogeant l'animal sur sa capacité à localiser l'emplacement d'une récompense alimentaire, les animaux ont donc été placés sous restriction alimentaire et maintenus entre 90% et 95% de leur poids initial afin d'accroître leur motivation. Un autre groupe de souris a été utilisé afin de réaliser les expériences de microdialyse permettant de mesurer la libération de corticostérone hippocampique. Plusieurs structures cérébrales (hippocampe, striatum..) ont été prélevées afin de réaliser les analyses de biologie moléculaire, de biochimie et d'immunohistochimie. Comme pour l'étude de carence en vitamine A, seuls les résultats obtenus sur l'hippocampe seront présentés.

Effectifs des animaux "CSD" :

- ☒ Groupe Agé Contrôle (N=12)
- ☒ Groupe Agé Contrôle supplémenté en vitamine A (N=10)
- ☒ Groupe Agé injecté avec du solvant (N=13)
- ☒ Groupe Agé injecté avec de l'AR (N=13)

Effectifs des animaux "Microdialyse" :

- ☒ Groupe Agé injecté avec du solvant (N=6)
- ☒ Groupe Agé injecté avec de l'AR (N=7)

I.2.3. Mise au point du dosage de l'AR dans les tissus

Des rats mâles Wistar (Janvier) âgés de 3 mois (n=20) ont reçu un régime alimentaire contrôle (5 UI rétinol/g ; INRA, Jouy-en-Josas, France) jusqu'à leur sacrifice.

II. Traitement par l'AR

L'AR (AR tout-*trans*, Sigma, France) a été préparé pour être injecté à une dose de 150µg/kg de poids corporel, dans un solvant constitué d'un mélange de Polyéthylèneglycol-NaCl-Ethanol (70:20:10). L'AR a été administré par voie sous-cutanée 4 jours avant le début des tests comportementaux et pendant toute la durée de l'expérience jusqu'aux sacrifices. La quantité d'AR utilisée était efficace pour reverser l'hypoexpression de certains gènes cibles des rétinoïdes au cours d'une carence en vitamine A (Etchamendy et al., 2003b; Husson et al., 2003) ou du vieillissement (Etchamendy et al., 2001).

III. Étude du niveau de corticostérone intrahippocampique par microdialyse chez la souris

III.1. Chirurgie stéréotaxique

Des guides sondes de microdialyse (CMA/7 ; CMA Microdialysis, Suède) ont été implantés sous anesthésie générale (10% Kétamine / 4% Xylasine, à raison de 0,1mL/10g de souris) par chirurgie stéréotaxique unilatéralement dans la région CA1 de l'hippocampe selon les coordonnées suivantes par rapport au bregma : AP: -2mm ; L: ±1,4mm ; H: 0,9mm. Les guides sondes ont été maintenus par du ciment dentaire (PalavitG, Promodentaire) et de la colle cyanoacrylate (Cyanolit). Suite à la chirurgie, les animaux ont bénéficié d'une période de récupération de 10 jours avant l'expérience de microdialyse *in vivo* pendant laquelle ils ont été contrôlés quotidiennement.

III.2. Microdialyse in vivo

La veille de la microdialyse, les animaux ont été placés dans l'enceinte de microdialyse (CMA/120 ; CMA Microdialysis, Suède) et la sonde de microdialyse (CMA/7 ; CMA Microdialysis, Suède ; Ø=0,24mm ; L=1mm) a été implantée à l'aide du guide sonde

dans l'hippocampe (Figure 4). Les souris ont alors été perfusées de solution saline tamponnée (solution tampon phosphate Dulbecco ; composition en g/L: CaCl₂, 0,133; MgCl₂, 0,1; KCl, 0,2; KH₂PO₄, 0,2; NaCl 8,0; Na₂HPO₄, 1,15; pH entre 7,1- 7,5 ; Sigma, France) à un débit de 0,5µl/min. Le matin de la microdialyse, le débit a été augmenté à 1,0µl/min. Après une période de stabilisation de 2h, des microdialysats de 15µl ont été recueillis toutes les 15 minutes pendant 1h30. L'animal a ensuite été placé dans un open-field modélisant l'enceinte où se déroule le test de mémoire du CSD (L.50 x 1.50cm x h.35cm) pendant 10 minutes. Le prélèvement des microdialysats s'était alors poursuivi durant les 2h qui ont suivi ce passage dans l'open-field. Ces microdialysats ont ensuite été conservés à -80°C avant d'être dosés.

IV. Test comportementaux

IV.1. Actimétrie

L'activité locomotrice basale des rats a été évaluée en utilisant des cages d'actimétrie (20cm x 33cm x 18cm, Imetronic, Pessac, France). Les animaux ont été placés dans ces cages pendant 1h. Des faisceaux infrarouges projetant sur des cellules photoélectriques situées respectivement à 4cm et 24cm ont été utilisés pour enregistrer les mouvements des animaux. Les analyses statistiques ont été traitées par block de 5min.

IV.2. Open field

Deux types d'open-field ont été utilisés afin de faire varier la demande exploratoire : l'open-field carré et l'open-field rond (*Figure 19*).

IV.2.1. Open-field carré

Un open-field a été utilisé pour analyser l'activité exploratrice spontanée et la curiosité des animaux face à un nouvel environnement. Le dispositif était composé d'une plateforme (1m x 1m) entouré de quatre murs de 50 cm. Le plancher était blanc et deux zones ont été définies : une zone périphérique et une zone centrale (50 cm²). Le test était effectué dans une pièce éclairée. Chaque rat était placé dans l'aire centrale puis, libre d'explorer le nouvel environnement pendant 10min. Afin de favoriser l'exploration, l'intensité lumineuse au centre du dispositif était relativement faible (60Lux). Plusieurs paramètres ont été enregistrés comme

l'activité locomotrice dans les différentes zones (correspondant à la distance parcourue), le temps passé dans l'aire centrale et dans l'aire périphérique par un système de vidéo tracking (Videotrack ; Viewpoint, Lyon, France). Les analyses statistiques ont été traitées sur la totalité de la durée du test.

IV.2.2. Open-field rond

Un second open-field a été utilisé dans le but de mieux caractériser le comportement exploratoire des animaux carencés. Le dispositif était constitué d'une plateforme circulaire (1m de diamètre). La plateforme était cloisonnée par un mur en plexiglas transparent (1m de diamètre x 30cm haut) qui permettait ainsi aux animaux de voir les indices visuels à l'extérieur du labyrinthe, proximaux et distaux présents dans la pièce. Le sol a été recouvert de la même sciure que celle présente dans les cages d'hébergement des animaux et elle était saturée en odeur de rat afin de limiter au maximum les aspects anxiogènes du test. Chaque rat a été placé pendant 10min dans le dispositif et l'activité locomotrice a été enregistrée par un système de vidéo tracking (Videotrack ; Viewpoint, Lyon, France). Les analyses statistiques ont été traitées par block de 1 min.

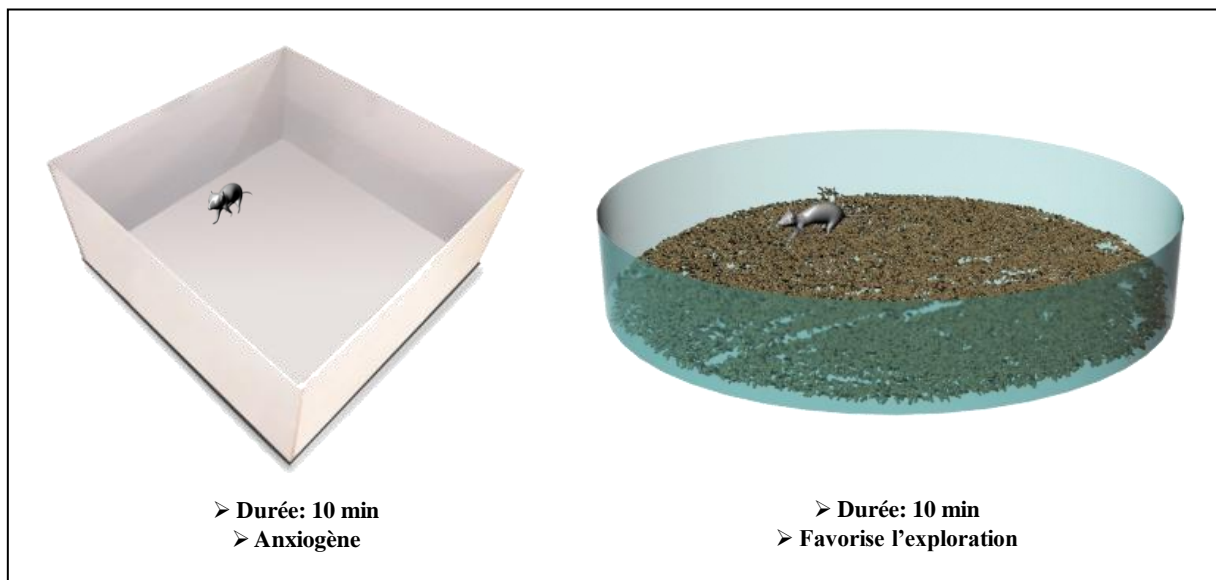


Figure 19 : Procédure comportementale dans les Open-field.

IV.3. Labyrinthe en croix surélevé ("Plus-maze")

Le comportement de type anxieux des animaux a été évalué dans le test du labyrinthe en croix surélevé (*Figure 20*). Le dispositif consiste comme son nom l'indique en un labyrinthe surélevé en plexiglas noir ayant la forme d'une croix avec deux branches opposées ouvertes (150 cm) et deux branches fermées (150 cm). Au centre se trouvait une plateforme ouverte (10cm x 10cm) sur les quatre bras. Le labyrinthe était situé à 50cm du sol et son centre était faiblement éclairé (70Lux). Les rats ont été placés sur la plateforme centrale, face à un des bras ouverts, et ils étaient libres d'explorer le labyrinthe pendant 5min. L'activité locomotrice et le temps passé dans les différentes zones (bras ouverts, bras fermés et centre) ont été enregistrés par un système de vidéo tracking (Videotrack ; Viewpoint, Lyon, France). Les analyses statistiques ont été traitées sur la totalité de la durée du test.

Ce dispositif était naturellement anxiogène (en ce qui concerne les bras ouverts) pour le rat, qui va spontanément éviter les bras ouverts et préférer les bras fermés. Ce test permet de déterminer l'état d'anxiété du rat, puisqu'il a été montré que des traitements pharmacologiques par des anxiolytiques étaient efficaces pour contrecarrer l'aversion naturelle procurée par les bras ouverts.

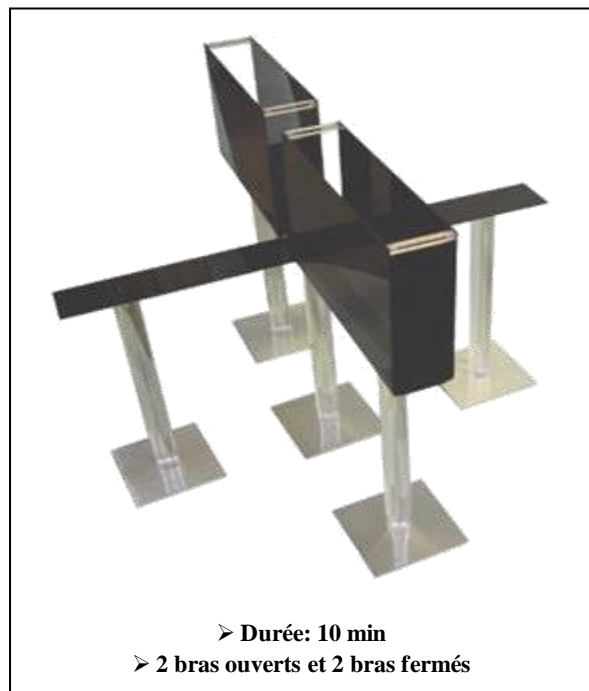


Figure 20 : Procédure comportementale dans le labyrinthe en croix surélevé.

IV.4. Labyrinthe aquatique de Morris

L'épreuve du labyrinthe aquatique mise au point par Morris (1984), permettait de mesurer les capacités d'apprentissage et de mémoire spatiale chez l'animal. Dans notre protocole expérimental, cette épreuve mettait plus particulièrement en jeu la mémoire spatiale de référence dépendante de la formation hippocampique. En effet, la tâche comportementale consistait pour l'animal à localiser un "but" spatial fixe, représenté ici par une plate-forme immergée dont la localisation reste constante, en utilisant des indices spatiaux distaux.

IV.4.1. Dispositif expérimental

Le dispositif était constitué d'une piscine circulaire de 1,80m de diamètre et de 60cm de profondeur. Elle était remplie d'une eau à 22°C rendue opaque par addition d'une peinture blanche non toxique. L'appareil était situé dans une pièce faiblement éclairée et comportant de nombreux indices visuels dont la localisation reste inchangée durant la durée du test. La piscine était divisée en quatre quadrants "virtuels" à l'intérieur desquels une plate-forme (15cm de diamètre) pouvait être positionnée à mi-chemin entre le centre et la paroi de la piscine. La hauteur de la plateforme étant réglable, elle pouvait donc être soit invisible (2cm en dessous de la surface de l'eau : configuration plate-forme immergée), soit visible signalée par des indices visuels. Au cours du test plusieurs paramètres ont été mesurés, tels que la vitesse de nage, le temps nécessaire pour atteindre la plate-forme (latence en secondes), la distance (en centimètres), enfin le tracé du chemin parcouru par les animaux a été enregistré. Ces paramètres ont été mesurés et enregistrés par un système de vidéo tracking (Vidéotrack, ViewPoint, Lyon, France). Afin de faciliter la détection de l'animal dans la piscine par le vidéo-traceur, la tête des rats blancs a été colorée en noir avec un produit non toxique.

IV.4.2. Protocole expérimental

Le protocole expérimental utilisé se déroulait en plusieurs phases (*Figure 21*): phase d'habituation, phase d'acquisition, phase de test sans plateforme (Probe test) et phase de test avec une plate-forme visible. Le protocole décrit par Drapeau et al. en 2003 a été utilisé. Ce dernier permettant de mettre en évidence des déficits mnésiques liés au vieillissement.

Phase d'habituation. Les animaux ont été placés dans la piscine en l'absence de plate-forme et l'explorent librement pendant deux séances de 60 secondes réparties sur deux jours consécutifs. Les rats ont été soumis à une habituation afin de diminuer le stress provoqué par l'eau et les conditions expérimentales.

Phase d'acquisition. Au cours de cette phase, qui constitue la phase d'apprentissage proprement dite, la tâche pour les animaux consistait à retrouver la plate-forme invisible (immergée) qui était située toujours dans le même quadrant, les autres quadrants servant alternativement de points de départ. Pour cela, les animaux ont été soumis à 4 essais de 90sec par jour, la durée de l'apprentissage variant en fonction des expériences. Les points de départ ont été choisis aléatoirement, ils changeaient d'un essai à l'autre, mais restaient constants d'un jour à l'autre. Un essai était terminé lorsque l'animal avait trouvé la plate-forme, ou dans le cas contraire au bout de 90sec. Le premier jour, l'animal était placé 60sec sur la plate-forme avant de débiter les quatre premiers essais de l'apprentissage. Par la suite, l'animal restait 60sec entre chaque essai sur la plate-forme. Les performances des animaux ont été évaluées par le temps (en secondes) nécessaire et la distance (en centimètres) parcourue pour atteindre la plate-forme immergée.

Phase de test sans plateforme (probe test). Le lendemain du dernier jour d'apprentissage, les animaux ont été placés dans la piscine dépourvue de plate-forme pendant 60sec. La mémoire spatiale a été évaluée par le temps passé dans le quadrant "cible", c'est-à-dire le quadrant où était localisée la plate-forme lors de la phase d'acquisition.

Phase de test avec plateforme visible. Afin de vérifier que les animaux ne présentaient pas de déficits visuels, moteurs ou motivationnels, la plate-forme visible (signalée par des indices visuels colorés) a été positionnée dans un quadrant différent de celui dans lequel elle se trouvait au cours de la phase d'apprentissage. Les animaux ont été testés dans cette

configuration pendant un jour, après la phase du "probe test", pendant 4 essais de 90sec chacun.

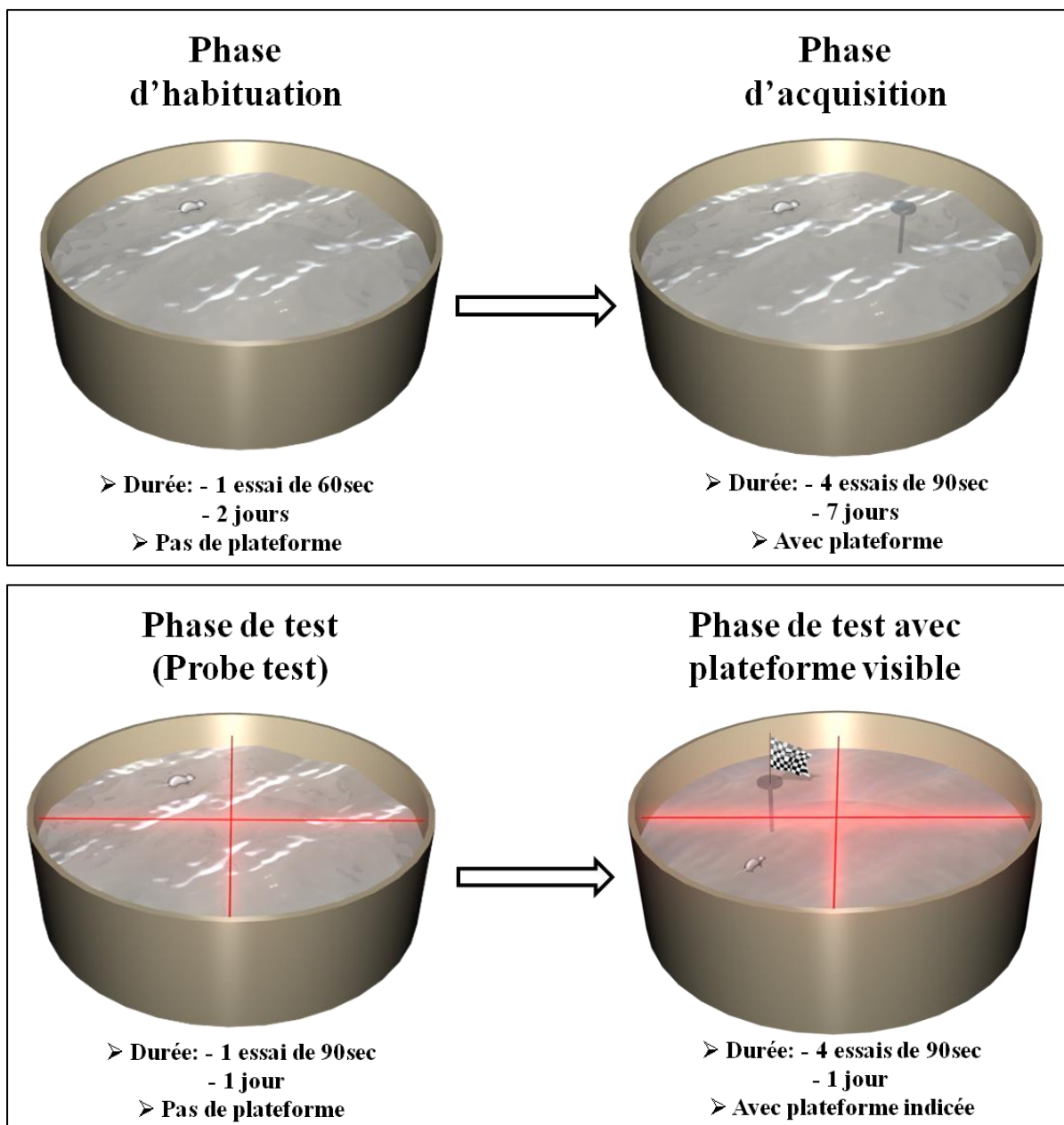


Figure 21 : Procédure comportementale dans le labyrinthe aquatique de Morris.

IV.5. Conditionnement de peur au contexte

Le principe de ce test reposait sur un conditionnement Pavlovien. Il s'agissait d'amener l'animal à associer un stimulus neutre (l'environnement de l'animal ou contexte) avec un stimulus désagréable (des chocs électriques). Une fois le conditionnement opéré, le

stimulus neutre devenait ainsi un stimulus conditionnel. En d'autres termes, l'animal avait appris que dans cet environnement, il recevait des chocs électriques. La réponse comportementale qui en découle est une réponse conditionnelle de peur caractéristique se traduisant par une immobilité de l'animal (également appelé "freezing"). Plusieurs études ont montré que l'encodage de cette information conditionnelle (liée au contexte) était dépendante de l'hippocampe (Jarrard, 1993; Holland and Bouton, 1999; Fanselow, 2000; Maren and Holt, 2000).

IV.5.1. Dispositif expérimental

La mémoire contextuelle hippocampo-dépendante des animaux a été évaluée dans le test de conditionnement de peur au contexte. Ce test a été réalisé dans des chambres de conditionnement rigoureusement identiques (40cm x 35cm x 30cm). Les parois des boîtes de conditionnement étaient constituées de PVC gris à l'exception de la face avant, pouvant s'ouvrir, fabriquée en Perplex transparent. Chaque chambre était située dans un caisson permettant (i) l'atténuation des bruits extérieurs et (ii) de délivrer un stimulus auditif puissant (5000Hz, 70dB, durant 10sec) via un haut-parleur. Un système de capture d'image (mini caméra SK-2005, Opto Vision, Toulouse, France) était placé dans chaque boîte et contrôlé par un ordinateur. Le sol des boîtes était constitué d'une grille métallique (27 barreaux de 0,5cm de diamètre et séparés de 1,5cm) reliée à un système délivrant des chocs électriques modérés (1sec à 0,4mA). Les sons et les chocs étaient contrôlés par un logiciel informatique (Imetronic, Pessac, France).

IV.5.2. Protocole expérimental

Le protocole expérimental utilisé se déroulait en plusieurs phases : une phase de conditionnement, une phase de test au contexte et une phase de test au son (*Figure 22*). Le protocole utilisé était similaire à celui décrit par le Dr M.Wolff avec qui nous avons collaboré (Dupire et al., 2013).

Phase de conditionnement. Le protocole de conditionnement au contexte utilisé consistait à distribuer de manière aléatoire (conditionnement non apparié) 5 sons (5000Hz, 70dB, durant 10sec) et 5 chocs (1sec à 0,4mA) aux animaux pendant 8min. Le son n'était donc pas prédictif

du choc dans ce protocole expérimental. Durant les 2 premières minutes du test, l'animal était libre d'explorer le dispositif et ne recevait aucun stimulus.

Phase de test au contexte. Le lendemain de la phase de conditionnement, la capacité des animaux à rappeler l'information aversive a été évaluée. Pour cela, le protocole utilisé consistait à replacer les animaux dans la même chambre que lors de la phase de conditionnement pendant 10min en ne leur présentant aucun stimulus.

Phase de test au son. Le lendemain du test au contexte, un test au son a été effectué dans le but de vérifier que les animaux ont bien tous été conditionnés de la même manière à savoir, fortement au contexte et très peu au son. Pour cela, les animaux ont été placés dans des chambres de conditionnement différentes (disposition de l'espace intérieur, plancher et indices visuels modifiés). Le test se déroulait sur 15min de la manière suivante : 5min de blanc (pas de son), suivis de 5min de son (5000Hz, 70dB), suivis de 5min de blanc.

Au cours des différentes phases, le temps d'immobilité des animaux a été évalué à l'aide d'un système automatisé (Marchand et al., 2003).

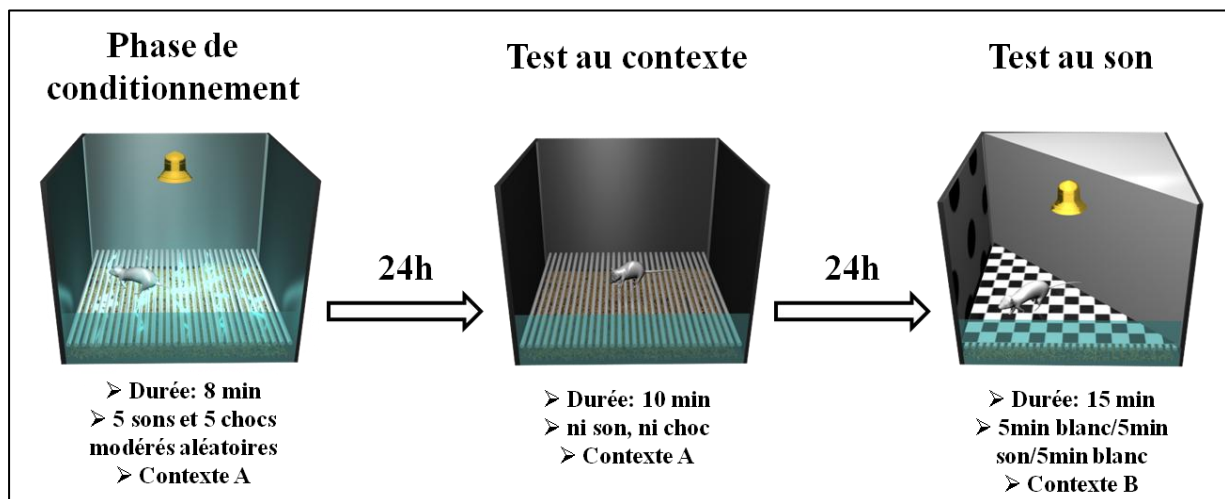


Figure 22 : Procédure comportementale dans le conditionnement de peur au contexte.

IV.6. Labyrinthe en Y

Le principe du test était basé sur la curiosité des rongeurs pour l'exploration et sur leur capacité à discerner un environnement qu'ils ont déjà exploré (familier), d'un environnement

qu'ils n'ont encore jamais découvert (nouveau). Il s'agissait alors dans ce test de forcer les animaux à explorer un environnement restreint (2 bras sur 3 possibles) dans un labyrinthe en forme Y, puis, après un certain délai, de les replacer dans ce même environnement avec cette fois-ci la possibilité d'explorer la totalité du dispositif (3 bras sur 3 possibles). Il a été montré que lorsque le délai entre les 2 expositions est suffisamment important, la capacité de l'animal à dissocier le bras familier du bras nouveau s'apparente à de la mémoire spatiale (Conrad et al., 1996).

IV.6.1. Dispositif expérimental

La mémoire de reconnaissance spatiale a été évaluée dans le labyrinthe en Y. Le dispositif (Imetronic, Pessac, France) fabriqué dans du PVC gris foncé était constitué de trois bras (50cm x 15cm x 35cm) disposés en Y. Des indices spatiaux distaux ont été implémentés dans la pièce autour de l'appareil et de la sciure saturée en odeur de rat a été placée sur le sol afin de favoriser l'exploration et de réduire les aspects anxiogènes inhérents au test comportemental.

IV.6.2. Protocole expérimental

Le protocole expérimental utilisé se déroulait en deux phases : une phase d'acquisition et une phase de rappel (*Figure 23*). Nous avons utilisé un protocole expérimental permettant l'évaluation de la mémoire spatiale (Wright and Conrad, 2005).

Phase d'acquisition. Durant cette phase, l'un des trois bras a été fermé à l'aide d'une porte amovible (soit le bras droit, soit le bras gauche) de manière aléatoire pour chaque animal. Les animaux ont été placés dans le bras de départ, libres d'explorer les 2 bras du labyrinthe pendant 5 min. A la fin du test, les rats ont ensuite été replacés dans leur cage d'hébergement.

Phase de rappel. Quatre heures après (délai nécessaire pour étudier la mémoire spatiale des animaux) les rats ont été replacés dans le dispositif, dans le même bras de départ que lors de la phase d'acquisition. Ils étaient libres d'explorer l'ensemble des trois bras pendant 5 min.

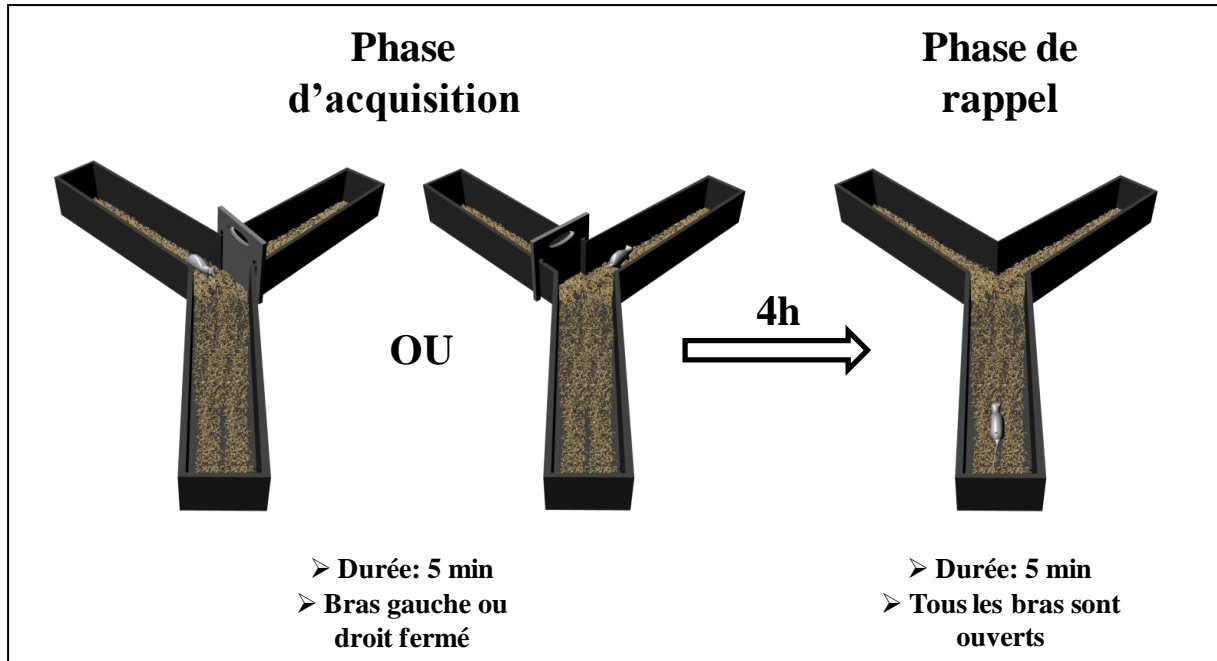


Figure 23 : Procédure comportementale dans le labyrinthe en Y.

Les déplacements animaux ont été enregistrés par un système de vidéo tracking (Videotrack ; Viewpoint, Lyon, France). Le pourcentage de premier choix correct, correspondant à la proportion de visites du nouveau bras lors du 1^{er} choix effectué par les animaux, a été évalué. D'autre part, le pourcentage de temps passé dans le nouveau bras (calculé de la manière suivante : (temps passé dans le nouveau bras / (temps passé dans le nouveau bras + temps passé dans le bras familier)) durant les 2 premières minutes du test (temps d'exploration de la nouveauté (Dellu et al., 1992)) a été évalué. Pour ces deux paramètres, le pourcentage de hasard était de 50%.

IV.7. Test de Discrimination Sérielle Contextuelle (CSD)

Afin d'évaluer l'effet d'une supplémentation en vitamine A ou d'un traitement par l'AR sur la mémoire hippocampo-dépendante des souris âgées de 14-15mois, le test mis au point par le Dr D.Béracochéa (INCIA) a été utilisé. Ce protocole, basé sur le comportement exploratoire de l'animal, permettait l'apprentissage de la discrimination et de la localisation spatiale de trous appâtés par un agent renforçant (pastilles de saccharose, 1mg ; Bioserv, France).

IV.7.1. Dispositif expérimental

Le CSD (ou "boîte à 4 trous") est une enceinte carrée en plexiglas gris opaque de 50cm de côté et 35cm de hauteur. Le plancher de la boîte est percé de 4 trous de 3cm de diamètre, situés dans chaque coin de l'enceinte à une distance de 4cm des parois. L'appareil est muni de plusieurs planchers interchangeables de couleur et de texture différentes (gris et lisse, blanc et rugueux, noir et lisse). Des cellules photoélectriques sont placées au fond de chaque trou et sont reliées à un ordinateur situé dans la pièce adjacente, permettant de mesurer la visite de chaque trou. Le comportement de l'animal est suivi par enregistrement vidéo. Le bruit de fond (bruit blanc de 10dB) et l'éclairage de la pièce (40Lux au centre de la boîte et 20Lux dans les coins) sont maintenus constants. Au commencement du test, l'animal est placé dans un cylindre de plexiglas opaque de 16cm de hauteur et 13cm de diamètre au centre de la boîte pendant 5sec pour permettre une orientation aléatoire dans l'appareil. L'appareil est nettoyé après le passage de chaque souris à l'eau pour limiter les traces olfactives qui permettraient aux suivantes d'avoir une représentation spatiale du dispositif. Des indices visuels sont positionnés sur les murs, 1m au dessus de l'appareil, et restent en place pendant toutes les phases du protocole.

IV.7.2. Protocole expérimental

Le test comporte 2 phases : l'acquisition et le test de restitution (*Figure 24*).

La phase d'acquisition se divise en 2 parties (6 minutes chacune, espacées de 2 minutes). Pendant la première partie (discrimination 1, appelée D1), l'animal a appris à discriminer la localisation spatiale d'un trou appâté avec 10 pastilles. Pour la deuxième partie (discrimination 2, appelée D2), l'opération a été renouvelée pour un trou différent (diagonal du premier) sur un plancher de couleur et de texture différente du premier.

La phase de test de restitution (ou rappel) a lieu 24 h après l'acquisition. L'animal a été testé sur un seul des 2 planchers. Aucun trou n'a été appâté. Dans cette étude, la discrimination D1 a été présentée au cours de la phase test pour les différents groupes (voir justification ci-dessous).

Le critère mesuré est le nombre de réponses correctes, correspondant aux visites du trou précédemment appâté dans le contexte testé. Le hasard est fixé à 25% (1 chance sur 4 de

visiter le bon trou). Les visites du trou appâté dans le contexte D2 sont dites réponses interférentes. Les visites des 2 trous qui ne sont appâtés dans aucun des 2 contextes sont dites réponses fausses.

L'autre critère pris en compte est la mémoire spatiale. Elle est évaluée par la somme des réponses correctes et des réponses interférentes. Elle est donc indépendante du contexte et de l'ordre temporel de la discrimination. Le hasard est alors fixé à 50 % puisque la souris a 2 chances sur 4 de visiter 1 des trous appâtés.

Les performances peuvent être variées. Dans le cas de la mémoire spatiale, la performance dépend uniquement de la mémorisation des indices visuels allocentriques externes à l'appareil. Le rappel est alors décontextualisé et met en évidence une forme générale du souvenir, la mémoire de référence.

Dans le cas des réponses correctes, il y a association entre le contexte interne et un ordre sériel. La mémoire sérielle contextuelle de type épisodique est alors mise en évidence (Beracochea et al., 2007).

Pour étudier ces différents types de mémoire, la phase de test n'a été réalisée qu'avec le plancher blanc (D1). En effet, les déficits mnésiques liés à l'âge ont été observés après la présentation de la discrimination D1 et ne nécessitent pas la présentation de la discrimination D2 lors de la phase de test. Le rappel de la discrimination D1 est hippocampo-dépendante, comme montré par Chauveau et al., 2009b qui met en évidence des déficits mnésiques chez des animaux présentant des lésions hippocampiques.

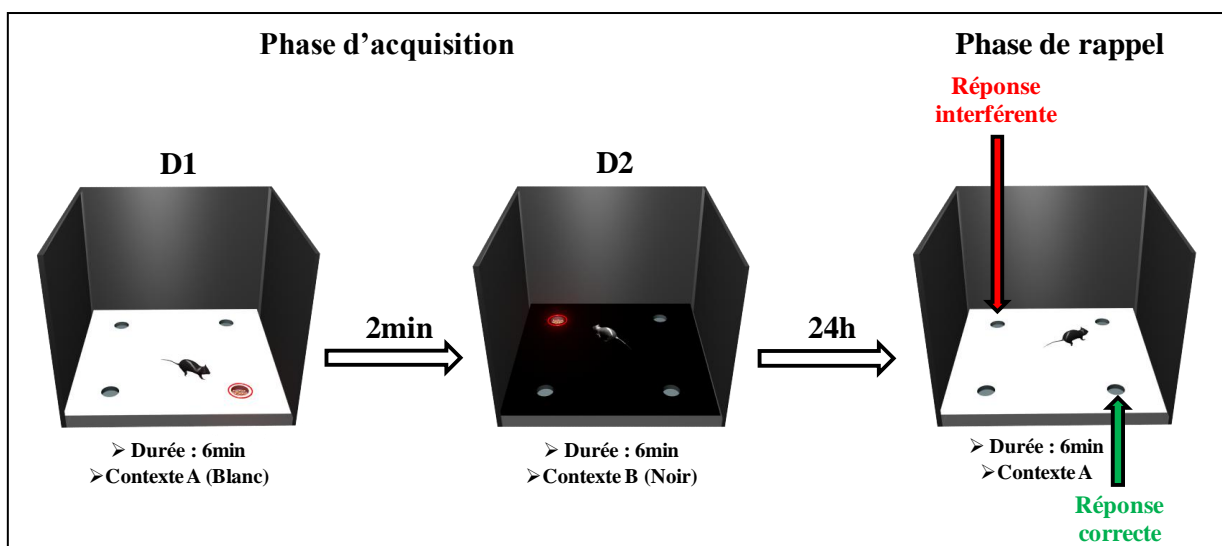


Figure 24 : Procédure comportementale dans le test de discrimination sérielle et contextuelle (CSD).

V. Sacrifices des animaux et préparation des tissus

Un jour après ou 20 min après la fin du dernier test comportemental, les animaux ont été anesthésiés par l'isoflurane avant d'être décapités. Pour réaliser les études immunohistochimiques, un hémisphère cérébral a été prélevé, lavé dans du chlorure de sodium (NaCl 9 %), puis post-fixé pendant 3 semaines dans du paraformaldéhyde 4%. Ces demi-cerveaux ont ensuite été coupés à l'aide d'un vibratome (Leica VT 1000S). Des coupes frontales sériées (10 séries) de 50µm d'épaisseur, ont ainsi été récupérées dans du tampon PBS (0,1M ; pH 7,4), et conservées à -20°C dans une solution cryoprotectrice contenant du glycérol (20%) et de l'éthylène glycol (30%).

Les structures cérébrales (hippocampe, hypothalamus, striatum et cortex préfrontal) ont également été rapidement prélevées à partir du deuxième hémisphère, puis immédiatement congelées dans de l'azote liquide et conservées à -80°C jusqu'au moment des analyses biochimiques et de biologie moléculaire.

VI. Études immunohistochimiques

VI.1. Étude de la neurogenèse

Au cours de l'étude portant sur les animaux carencés nous nous sommes intéressés au nombre de neurones néoformés au niveau de l'hippocampe en utilisant la Doublecortine (DCX), une phosphoprotéine associée aux microtubules. Elle est exprimée précocement au cours de la différenciation neuronale, au niveau des neurones immatures.

VI.1.1. Immunohistochime : marquage DCX

Les coupes flottantes ont été lavées dans du tampon PBS puis traitées avec du méthanol contenant 0,5% d'H₂O₂ afin de bloquer les peroxydases endogènes présentes dans les hématies.

Les coupes ont ensuite été lavées 4 fois dans le tampon pendant 10 min et incubées pendant 45 min avec du PBS-triton (0,3%) et du sérum normal de l'espèce produisant l'anticorps secondaire (3%) (Sérum d'Âne ; Abcys) afin de saturer les sites non spécifiques. Après élimination de la solution dite de "blocage", les coupes ont été incubées avec

l'anticorps primaire (IgG chèvre anti-DCX ; Santa-Cruz) dilué au 1/1000^e dans du tampon contenant du PBS-triton et du sérum normal (1%) sous agitation constante pendant 72h à 4°C. A l'issue de ces 72h, les coupes ont été à nouveau lavées dans du tampon PBS, puis incubées pendant 1h30 avec l'anticorps secondaire biotinylé dilué au 1/200^e (IgG Âne anti-chèvre (Amersham)). Elles ont ensuite été rincées dans du PBS et incubées dans une solution de streptavidine-biotine pendant 1h30.

Après plusieurs rinçages dans un tampon Tris, l'activité peroxydase a été révélée en employant la 3,3 diaminobenzidine (DAB ; 50mg/mL) comme chromogène. Ainsi, les coupes ont été incubées avec une solution de DAB et H₂O₂, et ont été ensuite lavées dans du tampon Tris et du Tris-NaCl avant d'être montées sur lames gélatinées.

VI.1.2. Déshydratation et montage des coupes

Après montage sur lames gélatinisées, les coupes ont ensuite été séchées pendant 24h puis déshydratées dans des bains successifs contenant des concentrations croissantes en éthanol (70°, 90°, 95°, 100°). Enfin, les coupes ont été imprégnées par un solvant (Histosol) et recouvertes d'une lamelle en utilisant un milieu de montage.

VI.1.3. Comptage du nombre de cellules immunoréactives

Le nombre de cellules immunoréactives dans le GD (DCX IR) a été compté toutes les 10 sections de l'axe rostro-caudal de la formation hippocampique à l'aide d'un microscope optique muni d'un système de contraste de phase. Pour chaque section, toutes les cellules sont comptées dans les couches granulaires et sous-granulaires.

VI.2. Vérification de l'implantation des guides-canules

Au cours de l'étude microdialyse portant sur les souris âgées, nous avons vérifié l'implantation des guide-canules dans l'hippocampe. Pour cela, des séries de coupes frontales (50µm) ont été réalisées au vibratome (Leica VT 1000S). Une série a été montée sur lames gélatinées, déshydratée et colorée au cresyl violet. La localisation des sites a été vérifiée sous microscope.

VII. Études de biologie moléculaire : Quantification des ARNm par RT-qPCR en temps réel

L'expression des gènes cibles des rétinoïdes et des glucocorticoïdes a été mesurée dans l'hippocampe par la technique de RT-qPCR. Dans l'étude portant sur la carence en vitamine A, nous avons quantifié l'expression hippocampique de la 11 β -HSD1. Dans l'étude portant sur le vieillissement l'expression hippocampique des récepteurs RAR et des gènes de plasticité synaptique suivants : Synaptophysine, RC3, GAP43, PSD-95.

VII.1. Extraction des ARNs

L'extraction des ARNs totaux a été réalisée à l'aide d'un kit d'extraction (TRIzol, Invitrogen, France) contenant du phénol et de l'isothiocyanate de guanidine. Les ARNs purifiés, suite à des séries de précipitations/lavages, ont été quantifiés et leur pureté a été vérifiée par dosage spectrophotométrique à l'aide du Nanodrop (Labtech, France). Par la suite, l'intégrité des ARNm a été vérifiée à l'aide d'un Bioanalyseur Agilent 2100 (Agilent Technologies) qui a permis de déterminer le ratio des ARNs ribosomiques 28S/18S grâce à une séparation électrophorétique.

VII.2. Rétro-transcription

L'utilisation d'oligonucléotides et d'amorces aléatoires (Promega, France) a permis la rétro-transcription des ARNs en ADNc en présence de la transcriptase reverse ImPromII (Promega, France). Brièvement, 1 μ g d'ARNs totaux a été incubé pendant 15min à 37°C en présence de RNasine (Promega, France) et de DNase (Roche, France). Ensuite, une deuxième incubation de 10min à 75°C a été réalisée pour inactiver la DNase en présence d'amorces oligodT (Promega) et d'amorces aléatoires (Promega). Enfin, la reverse transcription a été réalisée pendant 60min à 42°C, dans un volume final de 20 μ l contenant du tampon de transcription inverse 1X, du MgCl₂, des dNTP ainsi que la transcriptase reverse (200 unités).

VII.3. Amplification

La PCR (Polymérase Chain Reaction) a été réalisée à l'aide d'un thermocycler LightCycler 480 (Roche Diagnostics, France) qui combine le processus d'amplification à la détection en

temps réel des produits de PCR. Pour détecter les produits d'amplification, le kit LC 480 SYBR Green I Master a été utilisé. La réaction d'amplification a été réalisée dans des plaques de 96 puits dans un volume final de 20µl contenant 2,5ng d'ADNc, 0,5µM de chaque amorce amont et aval et le tampon LC 480 SYBR Green I Master (contenant le SYBR Green I, la Taq Hot Start polymerase, les dNTP et le MgCl₂). Cette plaque a alors subi les 50 cycles du programme PCR suivant : *dénaturation* (6sec, 95°C), *hybridation des amorces* (10sec, 62°C), *élongation* (6sec, 72°C). La fluorescence du SYBRGREEN a été mesurée à la fin de chaque cycle, reflétant l'expression du gène dans la structure considérée. Les séquences des amorces amont et aval utilisées pour l'amplification de chaque gène sont présentées dans le tableau 4.

VII.4. Quantification relative de l'expression des gènes étudiés

La quantité d'ADNc, qui reflète la quantité initiale d'ARNm, n'était pas connue en valeur absolue mais sa proportion a été déterminée par rapport à l'expression de gènes de référence (BMG et PPIB pour le rat ; Actin et GAPDH pour la souris) dont nous avons préalablement vérifié que l'expression était stable dans nos conditions expérimentales. Le LightCycler 480™ était équipé d'un logiciel de quantification relative permettant pour chaque échantillon de reporter les Cp du gène de référence et du gène d'intérêt sur les gammes standards préalablement établies afin de calculer le niveau d'expression du gène d'intérêt par rapport au gène de référence, normalisé par rapport au calibrateur. L'utilisation de gammes standards a aussi permis de corriger les variations potentielles d'efficacité de PCR entre le gène de référence et le gène d'intérêt, et d'intégrer cette variation d'efficacité de PCR dans le calcul du ratio gène d'intérêt/gène de référence.

Tableau 4 : Séquences des amorces utilisées. F : Forward (amorce amont) ; R : Reverse (amorce aval).

Amorces rats :

Gene name	Nucleotide sequence 5'-3'	Product length (bp)
BMG	F : GCCCAACTTCCTCAACTGCTACG	180
	R : GCATATACATCGGTCTCGGTGGG	
PPIB	F : GTTCTGGAAGGCATGGATGT	153
	R : TCCCCGAGGCTCTCTCTACT	
Synaptophysin	F : AATACTTGGAGGCTGGGTCTGG	107
	R : GGGACCACAGTCAGACAAAATGG	
RC3	F : GCTCCAAGCCAGACGACGATATTC	127
	R : CACTCTCCGCTCTTTATCTTCTTC	
GAP43	F : AGAAAGCAGCCAAGCTGAGGAGG	169
	R : CAGGAGAGACAGGGTTCAGGTGG	
RARα	F : GCCTCGATTCTACAAGCCTTGC	107
	R : GGATACTGCGTCGGAAGAAGC	
RARβ	F : CAGCTGGGTAAATACACCACGAA	227
	R : GGGGTATACCTGGTACAAATTCTGA	
RARγ	F : GCCCTAAGGCTTTATGCCCGG	104
	R : GCTCCCTTGGTGCTGATGCC	
RXRα	F : GCTGGTGTCGAAGATGCGTGAC	171
	R : GGGTACTTGTGTTTGCAGTACG	
RXRβ	F : TGGGAACAGGGAGAATGTGG	129
	R : CTGGAAAGCGACTTTATGTGCAAG	
RXRγ	F : GGAAAGACCTCATCTACACG	123
	R : CAGCTTCCCTCTTCATGCCC	
11β-HSD1	F : AAAATACCTCCTCCCCGTCTG	129
	R : TCTCTTCCGATCCCTTTGCTG	
GR	F : GGGACCACCTCCCAAGCT	63
	R : ACCCCGTAATGACATCCTGAAG	
MR	F : CTTTACGAAGTGTTTCTACTGGATCCT	79
	R : TGACACCCAGAAGCCTCATCT	

Amorces souris :

Gene name	Nucleotide sequence 5'-3'	Product length (bp)
GAPDH	F : CCAGTGAGCTTCCCGTTCA	78
	R : GAACATCATCCCTGCATCCA	
Actin	F : AAAACGCAGCTCAGTAACAGTCC	220
	R : AGGATGCAGAAGGAGATTACTGC	
Synaptophysin	F : TCCTTGCATGTGTTTCCTGTCTG	137
	R : GCAGTGTTCGCTTTCATGTGG	
PSD-95	F : TGGATCACAGGGTCGAGAAG	101
	R : CTTTGGTAGGCCCAAGGATG	
RC3	F : CACTCTCCGCTCTTTATCTTCTTC	127
	R : GCTCCAAGCCAGACGACGATATTC	
GAP43	F : GGGGAGTTATCAGTGGTAGC	255
	R : GTGATGCACCAGCTGCTGAGG	
RAR α	F : GGCGAACTCCACAGTCTTAATG	118
	R : GCTGGGCAAGTACACTACGAAC	
RAR β	F : GGGGTATACCTGGTACAAATTCTGA	227
	R : CAGCTGGGTAAATACACCACGAA	
RAR γ	F : CCAAGGATGCTGATGAAAATC	63
	R : GCCCTTTCTGCTCCCTTAGTG	
RXR α	F : CCATCTTTGACAGGGTGCTAACA	55
	R : ATCTGCATGTCACGCATCTTAGAC	
RXR β	F : GCGCCAGCGGAATCG	73
	R : AACCGCCTCCCTTTTCATG	
RXR γ	F : ATTGGAATATGAACTACCCATCCA	94
	R : CGTAGTGCTTCCCTGAGGATCT	
11 β -HSD1	F : GGAAGGTCTCCAGAAGGTAGTGTC	51
	R : GAGGCTGCTCCGAGTTCAAG	
GR	F : GTGGAAGGACAGCACAATTACCT	87
	R : GCGGCATGCTGGACAGTT	
MR	F : GCCGTGGAAGGACAACACA	125
	R : CCTAAGTTCATGCCGGCTTG	

VIII. Études Biochimiques

VIII.1. Dosage de la corticostérone plasmatique et de la CBG

Le sang a été rapidement collecté après décapitation des animaux, puis centrifugé à 10000G pendant 10min. Le plasma a été prélevé et conservé à -80°C . Les analyses de corticostérone plasmatique totale et libre ainsi que les mesures de capacité de liaison de la CBG ont été évaluées dans les mêmes échantillons.

VIII.1.1. Corticostérone plasmatique totale

La concentration plasmatique en corticostérone totale a été mesurée par RIA (Radio Immuno Assay) selon la méthode décrite par Richard et al. 2010. Rapidement, après une extraction des stéroïdes contenus dans le plasma avec de l'éthanol absolu, la corticostérone totale a été mesurée par compétition entre la corticostérone froide et la ^3H -corticostérone en utilisant un anticorps anti-corticostérone fourni par le DR H.Vaudry -Université de Rouen, France).

VIII.1.2. Corticostérone plasmatique libre

La concentration plasmatique en corticostérone libre a été mesurée par dilution isotopique et ultrafiltration plasmatique en utilisant un système Centrifree[®] filter (YM membranes 30K, Millipore, France) comme décrit par Richard et al. 2010, à partir de 100 μl de plasma. La fraction de corticostérone libre a été calculée en faisant le ratio de cpm (count per minute) filtré (correspondant à la corticostérone libre/cpm de la corticostérone totale).

VIII.1.3. Capacité de liaison de la CBG

La capacité maximale de liaison de la CBG (B_{max}) ainsi que le K_d ont été mesurés à l'aide d'une courbe de saturation et d'une analyse de Scatchard (Richard et al., 2010) en utilisant une gamme de concentration croissante d'échantillons de corticostérone radio-marquée (jusqu'à 64nM).

VIII.2. Dosage de la corticostérone intrahippocampique

VIII.2.1. A partir de la structure cérébrale

Dans l'étude portant sur la carence en vitamine A chez le rat, la corticostérone intrahippocampique a été évaluée à partir de la structure cérébrale. Les protéines totales des hippocampes ont été extraites. Pour cela, ils ont été broyés et homogénéisés dans une solution tampon anti-phosphatase (PIC : 1X; NaOV: 2mM; NaF : 1mM; Tampon de lyse : qsp 15mL) (Tampon de lyse : Tris/HCl pH 7.4 : 20mM; EDTA : 1mM; DTT : 1mM ; MgCl₂ : 5mM H₂O MQ : qsp 15mL) à l'aide d'un homogénéiseur Precellys[®] pendant 30sec. Les échantillons ont ensuite été centrifugés à 3000rpm durant 5min à 4°C. Le surnageant a ensuite été recueilli puis les protéines totales ont été dosées en utilisant un kit BCA (Uptima, Montluçon, France) et un lecteur de plaque Victor 3V (PerkinElmer).

La concentration en corticostérone des échantillons a été déterminée par un dosage ELISA (kit commercial : Correlate-EIA[™], Assay Designs, Ann Arbor, USA) en chargeant une concentration en protéines totales de 6mg/mL

VIII.2.2. A partir microdialysats

Dans l'étude portant sur le vieillissement chez la souris, la corticostérone intrahippocampique a été évaluée à partir des microdialysats. Ces derniers ont été dosés à l'aide d'un kit commercial ELISA (Correlate-EIA[™], Assay Designs, Ann Arbor, USA). La lecture de la plaque ELISA a été effectuée en utilisant un lecteur de plaque Victor 3V (PerkinElmer).

VIII.3. Dosage de l'activité enzymatique de la 11 β -HSD1

Dans l'étude portant sur la carence en vitamine A chez le rat, l'activité enzymatique de la 11 β -HSD1 au niveau de l'hippocampe a été évaluée à partir des homogénats de protéines totales (voir Matériels et Méthodes VIII.3.1.). L'activité déshydrogénase de la 11 β -HSD1 a été mesurée en quantifiant la conversion de la corticostérone (B) en 11-déshydrocorticostérone (A) (Moisan et al., 1990). Pour cela, 0,5mg/mL de protéines totales ont été incubés à 37°C pendant 1h avec 12nM de ³H-corticostérone comme substrat (activité spécifique: 78,1Ci/mmol, PerkinElmer) et 400nM de NADP⁺ correspondant au co-facteur spécifique de

l'enzyme mis en excès. Après l'incubation, les stéroïdes ont été extraits par séparation de phase après ajout de 1mL d'éthyle acétate. Ils ont ensuite été séparés par chromatographie en couche mince sur gel de silice (TLC Silica Gel 60 F254, VWR) en utilisant un mix Chloroforme/Ethanol (92/8) pendant 30min. La révélation et la quantification de la radioactivité émises ont été effectuées grâce à un appareil β -Imager. Ainsi, l'activité de l'enzyme correspondait au pourcentage de conversion de la ^3H -corticostérone en ^3H -déshydrocorticostérone.

VIII.4. Dosage du rétinol sérique

Le sang a été rapidement collecté après décapitation des animaux, puis centrifugé à 5000G pendant 15min. Le sérum a été prélevé et conservé à -20°C . La concentration en rétinol plasmatique a été déterminée par CLHP (Chromatographie Liquide à Haute Performance) selon la méthode décrite par Leclercq and Bougeay-Causse (1981).

IX. Analyses statistiques

Les données ont été traitées par des analyses de variance (ANOVA) avec mesures répétées (apprentissage) ou à un facteur suivi du test post-hoc de Fisher permettant de comparer entre eux plusieurs groupes expérimentaux pour une variable donnée. Les résultats ont été exprimés en moyenne \pm erreur standard (SEM). Les valeurs de $p < 0,05$ ont été considérées comme statistiquement significatives.

PARTIE I

EFFET D'UNE CARENCE ET D'UNE SUPPLÉMENTATION EN VITAMINE A SUR LA VOIE D'ACTIVITÉ DES GLUCOCORTICOÏDES ET CONSÉQUENCES SUR LA NEUROGENÈSE ET LES PROCESSUS ÉMOTIONNELS ET MNÉSQUES

I. Introduction

Les données bibliographiques plaident en faveur d'un rôle essentiel joué par les rétinoïdes dans le fonctionnement du cerveau adulte et en particulier dans la plasticité hippocampique et les fonctions mnésiques chez l'animal âgé (Etchamendy et al., 2001; Mingaud et al., 2008; Touyarot et al., 2013) mais également chez l'animal carencé en vitamine A (Bonnet et al., 2008).

Par ailleurs, quelques données dans la littérature montrent des interactions entre la voie de signalisation des rétinoïdes et celle des glucocorticoïdes, connue pour jouer un rôle important dans la modulation des processus mnésiques (Yau and Seckl, 2012). Ainsi, certaines études ont montré l'action inhibitrice d'un traitement par l'AR sur l'hyperactivité de l'axe corticotrope dans un modèle expérimental de syndrome de Cushing provoqué par une tumeur de l'hypophyse, ce traitement permettant le rétablissement des niveaux de corticostérone plasmatiques (Paez-Pereda et al., 2001). D'autres données montrent également cette action inhibitrice de l'AR sur l'expression de la 11 β -HSD1, enzyme impliquée dans la synthèse intracellulaire des glucocorticoïdes, dans des cellules de muscles (Aubry and Odermatt, 2009). De plus, des études chez le rat obèse (Sakamuri et al., 2011) et très récemment chez le rat carencé en vitamine A (Arvy et al., 2013) ont permis de confirmer l'effet antagoniste de la voie des rétinoïdes sur celle des glucocorticoïdes. De manière intéressante, cette dernière étude montre une surexpression de 11 β -HSD1 dans l'hippocampe ainsi qu'une hyperactivation de l'axe corticotrope en condition basale et après un stress aigu chez le rat LOU/C carencé en vitamine A, ces effets délétères étant réversés par un traitement par l'AR. En revanche, à ce jour, aucune étude ne s'est intéressée à l'impact de la modulation du statut en vitamine A sur celle des glucocorticoïdes et ses conséquences sur les processus de plasticité et de mémorisation.

Dans ce contexte, notre étude vise à mieux comprendre :

- (i) Si les conséquences d'une hypoactivité de la voie de signalisation de la vitamine A, induite spécifiquement par un régime carencé en vitamine A, sur les processus émotionnels et mnésiques passent par une modulation de la voie des glucocorticoïdes.
- (ii) Si une supplémentation nutritionnelle en vitamine A permet de moduler la voie de signalisation des glucocorticoïdes et ainsi de rétablir les effets délétères de la carence en vitamine A sur les processus émotionnels et mnésiques.

II. Méthodologie

Nous avons étudié l'effet d'une carence en vitamine A de 10 semaines sur l'activité locomotrice mesurée dans un test de réactivité à la nouveauté. Quatre groupes de rats ont ensuite été constitués et équilibrés en fonction de leur poids mais également de leur niveau d'activité locomotrice à partir de la dixième semaine de carence. La moitié des rats témoins et carencés ont alors été soumis à un régime enrichi en vitamine A durant les 4 semaines suivantes. Les effets d'une carence prolongée en vitamine A et d'une supplémentation de 4 semaines ont été étudiés sur (i) les processus mnésiques dans une épreuve de mémoire de référence spatiale dans la piscine de Morris et (ii) le comportement de type anxieux dans le test du labyrinthe en croix surélevé. Les concentrations en corticostérone plasmatique et intrahippocampique ainsi que l'expression et l'activité de l'enzyme 11 β -HSD1 dans l'hippocampe ont été quantifiées. Par ailleurs, les différentes étapes de la neurogenèse hippocampique ont été analysées par immunohistochimie.

III. Principaux résultats

De manière intéressante, nous montrons que le statut en vitamine A est capable de moduler les niveaux de corticostérone libre dans le plasma et dans l'hippocampe en agissant sur son transporteur la CBG mais également sur l'activité hippocampique de la 11 β -HSD1. Par ailleurs, nos résultats suggèrent que l'hyperactivité des glucocorticoïdes observée chez les animaux carencés en vitamine A pourrait avoir des conséquences délétères sur (i) les processus de mémoire hippocampo-dépendants observés dans le labyrinthe aquatique de Morris, (ii) le comportement de type anxieux évalué dans le labyrinthe en croix surélevé et

également (iii) sur les processus de plasticité cérébrale comme la neurogenèse hippocampique. De manière intéressante, la supplémentation en vitamine A pendant 4 semaines permet de contrecarrer les effets délétères d'une suractivation de la voie des glucocorticoïdes sur la mémoire et l'anxiété en rétablissant les niveaux de CBG, d'activité d'11 β -HSD1 et de CORT libre au niveau de l'hippocampe.

IV. Conclusion

Ces résultats confortent l'hypothèse générale de la thèse qui postule qu'une diminution de la voie de signalisation des rétinoïdes serait à l'origine d'une levée d'inhibition sur la voie de signalisation des glucocorticoïdes engendrant l'hyperactivation de celle-ci. Ils mettent en évidence pour la première fois une interaction entre le statut en rétinoïde, le statut en glucocorticoïde et la mémoire hippocampo-dépendante. Ce travail a fait l'objet d'une publication acceptée dans **Frontiers in Behavioral Neuroscience**.



Vitamin A status regulates glucocorticoid availability in Wistar rats: consequences on cognitive functions and hippocampal neurogenesis?

Damien Bonhomme^{1,2}, Amandine M. Minni^{1,2}, Serge Alfos^{1,2}, Pascale Roux^{1,2}, Emmanuel Richard³, Paul Higuieret^{1,2}, Marie-Pierre Moisan^{1,2}, Véronique Pallet^{1,2†} and Katia Touyarot^{1,2*†}

¹ INRA, Nutrition et Neurobiologie Intégrée (NutriNeuro), UMR 1286, Bordeaux, France

² University of Bordeaux, Nutrition et Neurobiologie Intégrée (NutriNeuro), UMR 1286, Bordeaux, France

³ INSERM, Biothérapie des Maladies Génétiques et Cancer, U1035, Bordeaux, France

Edited by:

Regina M. Sullivan, Nathan Kline Institute and NYU School of Medicine, USA

Reviewed by:

Phillip R. Zoladz, Ohio Northern University, USA

Anne Didier, Université Lyon 1, France

*Correspondence:

Katia Touyarot, INRA, Nutrition et Neurobiologie Intégrée, University of Bordeaux Segalen, UMR 1286, 146, rue Léo Saignat, F-33000 Bordeaux, France

e-mail: katia.touyarot@enscbp.fr

† These authors have contributed equally to this work.

A disruption of the vitamin A signaling pathway has been involved in age-related memory decline and hippocampal plasticity alterations. Using vitamin A deficiency (VAD), a nutritional model leading to a hyposignaling of the retinoid pathway, we have recently demonstrated that retinoic acid (RA), the active metabolite of vitamin A, is efficient to reverse VAD-induced spatial memory deficits and adult hippocampal neurogenesis alterations. Besides, excess of glucocorticoids (GCs) occurring with aging is known to strongly inhibit hippocampal plasticity and functions and few studies report on the counteracting effects of RA signaling pathway on GCs action. Here, we have addressed whether the modulation of brain GCs availability could be one of the biological mechanisms involved in the effects of vitamin A status on hippocampal plasticity and functions. Thus, we have studied the effects of a vitamin A-free diet for 14 weeks and a 4-week vitamin A supplementation on plasma and hippocampal corticosterone (CORT) levels in Wistar rats. We have also investigated corticosteroid binding globulin (CBG) binding capacity and 11 β -Hydrosteroid Dehydrogenase type 1 (11 β -HSD1) activity, both important modulators of CORT availability at the peripheral and hippocampal levels respectively. Interestingly, we show that the vitamin A status regulates levels of free plasma CORT and hippocampal CORT levels, by acting through a regulation of CBG binding capacity and 11 β -HSD1 activity. Moreover, our results suggest that increased CORT levels in VAD rats could have some deleterious consequences on spatial memory, anxiety-like behavior and adult hippocampal neurogenesis whereas these effects could be corrected by a vitamin A supplementation. Thus, the modulation of GCs availability by vitamin A status is an important biological mechanism that should be taken into account in order to prevent age-related cognitive decline and hippocampal plasticity alterations.

Keywords: Vitamin A status, retinoic acid, glucocorticoid, spatial memory, anxiety-like behavior, hippocampal neurogenesis, 11 β -Hydrosteroid dehydrogenase type 1, corticosteroid binding globulin

INTRODUCTION

The vitamin A, through its main metabolite retinoic acid (RA), plays a key role in cognitive functions and more specifically in anxiety-like behavior and hippocampus-dependent memory during adulthood (Lane and Bailey, 2005; McCaffery et al., 2006; Cai et al., 2010; Olson and Mello, 2010). A disruption of RA signaling pathway has been involved in age-related memory decline (Etchamendy et al., 2001; Mingaud et al., 2008). Interestingly, in these studies life-long nutritional vitamin A supplementation or RA treatment corrected memory deficits in aged rodents. The involvement of retinoids in the control of hippocampal plasticity, known to underlie spatial memory processing (Eichenbaum et al., 1999; Eichenbaum, 2004), has been largely demonstrated in Vitamin A Deficiency (VAD) models, a nutritional approach leading to a hyposignaling of RA pathway. Thus, VAD disrupted hippocampal long-term potentiation (Misner et al., 2001; Jiang

et al., 2012), hippocampal neurogenesis (Jacobs et al., 2006) and induced spatial and relational memory deficits (Cocco et al., 2002; Etchamendy et al., 2003). Furthermore, we have recently demonstrated that VAD-induced hippocampal neurogenesis alterations and spatial memory deficits could be corrected by RA treatment (Bonnet et al., 2008).

Yet, it is still not clear how the vitamin A status modulates plasticity and memory processes. On the one hand, it is now commonly accepted that RA regulates gene expression including plasticity-related genes through binding to specific nuclear receptors: retinoic acid receptors (RARs) or retinoid X receptors (RXRs) (Marill et al., 2003). It has been shown that VAD could alter hippocampal plasticity and functions through a hypoexpression of some retinoid receptors, which has been associated with decreased plasticity-related target gene expression (Etchamendy et al., 2003; Husson et al., 2003, 2004). On the other hand,

it has recently been proposed that the stimulation of retinoid signaling pathway antagonizes glucocorticoid-mediated actions (Paez-Pereda et al., 2001; Aubry and Odermatt, 2009; Brossaud et al., 2013). Thus, the deleterious effects of VAD may also be explained by a more indirect action of vitamin A status on the availability of glucocorticoids (GCs) in the hippocampus.

The hippocampus is a prime target for GCs as it contains the highest number of GCs receptors that can modulate memory processes (Oitzl and de Kloet, 1992). High levels of circulating GCs as a consequence of chronic stress or aging are known as risk factors in the development of psychopathologies (de Kloet et al., 2005). Thus, prolonged exposure to an excess of corticosterone (CORT) in rodents can lead to hippocampal atrophy with a significant disbranching and shortening of apical dendrites (Magarinos and McEwen, 1995; McEwen, 1999; Krugers et al., 2010) and these hippocampal alterations have been correlated with memory impairments (Sousa et al., 2000; Sandi, 2003; Sandi et al., 2004; Joels and Krugers, 2007). A reduction in adult hippocampal neurogenesis after chronic CORT exposure is also associated with learning impairments (Montaron et al., 2006; Klempin and Kempermann, 2007; Yau et al., 2012).

The magnitude of CORT action in the rodent hippocampus is thought to be determined (i) by the activity of hippocampal 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase type 1 (11 β -HSD1), an enzyme that regenerates active CORT within cells, and (ii) by free CORT circulating in the blood, delivered to the brain (Seckl, 1997) and regulated by corticosteroid binding globulin (CBG) (Breuner and Orchinik, 2002). Both the hyperactivity of hippocampal 11 β -HSD1 and elevated plasma CORT, are correlated with impairments in hippocampal-dependent memory tasks during aging (Yau et al., 2001; Holmes et al., 2010; Yau and Seckl, 2012). Interestingly, the inhibitory effects of RA and vitamin A supplementation have been shown on the expression and the activity of 11 β -HSD1, in differentiated C2C12 myotubes (Aubry and Odermatt, 2009), in obese rat liver (Sakamuri et al., 2011) but also in vitamin A-deficient LOU/C rats (Arvy et al., 2013). Indeed, in this latter study, the VAD-induced up-regulation of the hippocampal expression of 11 β -HSD1 has been associated to an increased Hypothalamic-Pituitary-Adrenal (HPA) axis activity in basal and stress conditions which has been normalized by a RA treatment (Arvy et al., 2013). Finally, a RA treatment inhibits the hypersecretion of CORT in an experimental model of the Cushing's syndrome (Paez-Pereda et al., 2001) suggesting that it could be used as a successful treatment to reverse endocrine and cognitive alterations found in stress-related disorders.

Thus, these data show some antagonistic effects between GCs and retinoid pathways. Here, we hypothesize that the stimulation of the retinoid pathway could be a successful strategy to counteract the deleterious effects of an excess of GCs on hippocampal plasticity and functions. The effects of VAD and supplementation on hippocampus-dependent memory and anxiety-like behavior have been assessed. To clarify the molecular mechanisms underlying VAD-induced behavioral alterations, we have evaluated how vitamin A status could modulate GCs availability both at the peripheral and the hippocampal levels. Thus, we have demonstrated for the first time that VAD induced an elevated free CORT in the plasma and the hippocampus, a downregulation of

plasma CBG binding capacity and a hyperactivity of hippocampal 11 β -HSD1. Moreover, such deleterious effects are associated with spatial memory deficits, elevated anxiety, and decreased hippocampal neurogenesis in VAD rats, which could be corrected by a vitamin A supplementation. Thus, acting on vitamin A status could be a good strategy to prevent excess GCs-induced cognitive decline occurring with aging.

MATERIALS AND METHODS

ANIMALS

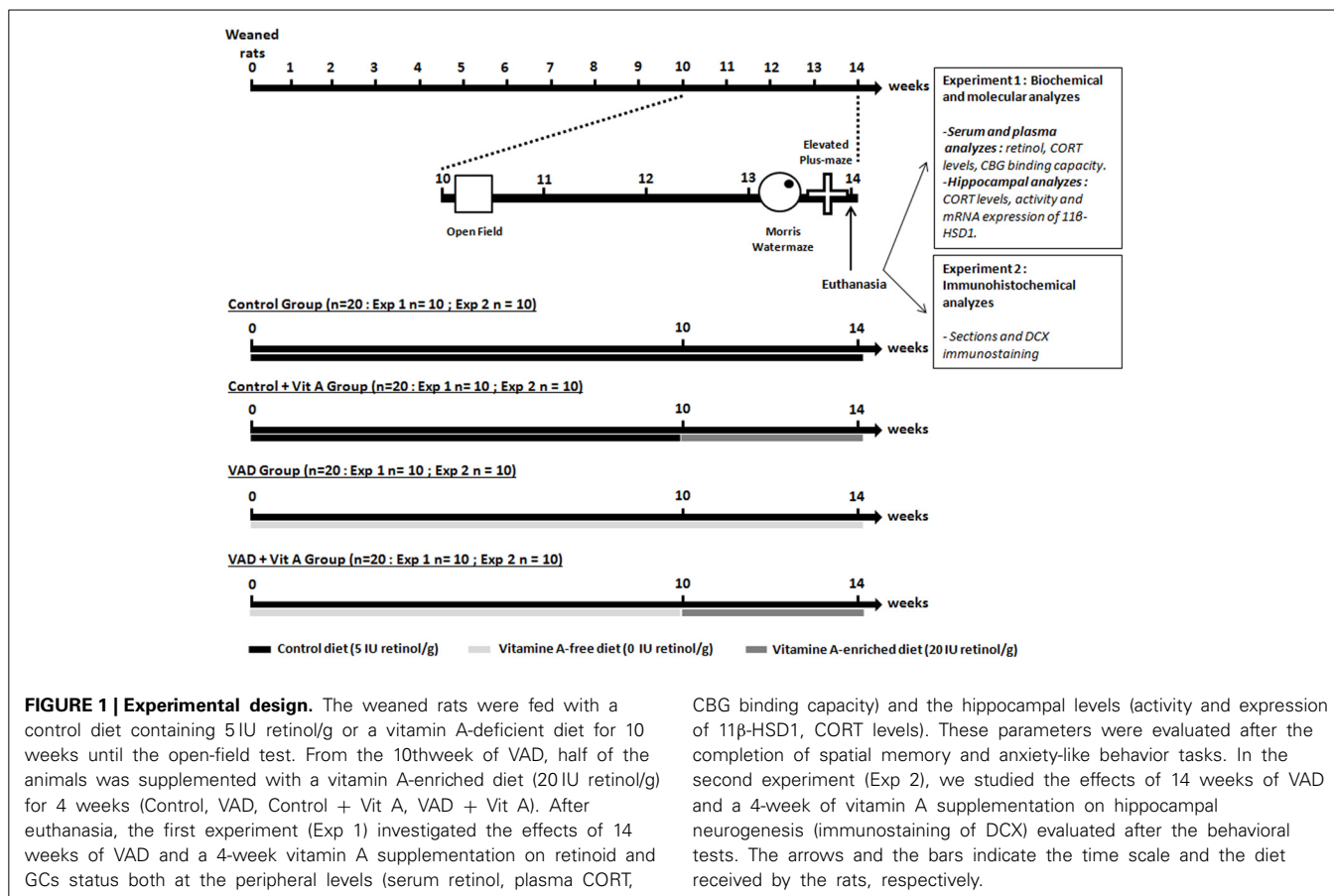
Weaned male Wistar rats (3 weeks old) were purchased from Janvier (Le Genest Saint-Isle, France). They were housed two per cage in a room with a constant airflow system, controlled temperature (21–23°C), and a 12 h light/dark cycle. Rats were given *ad libitum* access to food and water and weighed twice a week. As in (Bonnet et al., 2008), 1 week prior to the beginning of behavioral experiments, all animals were housed individually until sacrifice. All experiments were performed in accordance with the European Communities Council Directives (86/609/EEC) and the French national Committee (87/848) recommendations, and have been approved by the Animal Care and Use Committee of Bordeaux under the N°50120169-A.

DIET

At their arrival, the weaned rats were randomly assigned to two experimental groups: one group ($n = 40$) received a vitamin A-free diet (Laboratorio Piccionni, Italy), whereas the second one ($n = 40$) was fed with a control diet containing 5 IU retinol/g (INRA, Jouy-en-Josas). Subsequently, the weaned rats ($n = 80$) have been fed with a control diet containing 5 IU retinol/g or a vitamin A deficient diet (0 IU retinol/g) for 10 weeks. They are referred to as control rats ($n = 40$) and VAD rats ($n = 40$), respectively. Then, half of the vitamin A-deficient rats ($n = 20$) and half of the control rats ($n = 20$) have been supplemented with a vitamin A-enriched diet (20 IU retinol/g) for 4 weeks: they were referred to as VAD + Vit A and Control + Vit A, respectively while the other halves have been kept on their respective diets. The supplemented vitamin A diet (20 IU retinol/g) has been used, as it has been shown to be effective in reversing the VAD-related memory decline (Cocco et al., 2002).

EXPERIMENTAL DESIGN

We have studied the effects of vitamin A status (deficiency and supplementation) on CORT availability at the plasma and the hippocampal levels and its impact on hippocampal plasticity and functions (Figure 1). After 10 weeks of diet, the two experimental groups (Controls $n = 40$, VAD $n = 40$) were tested in the open field test with a systematic characterization of locomotor reactivity to novelty. We could thus subdivide the two experimental groups and equilibrate their activity scores: half of the controls and half of the VAD rats (Controls, VAD, Control + Vit A, VAD + Vit A) have been supplemented during the next 4 weeks. Thirteen weeks after their arrival, rats were trained and tested in a Morris water maze spatial reference memory task followed by an elevated plus maze to assess their anxiety-like behavior. One day after the anxiety test, all groups were sacrificed in the morning; blood samples and hippocampi were collected for further biochemical and



biomolecular analyzes (experiment 1) and immunohistochemical analyzes (experiment 2).

BEHAVIORAL TESTS

Open-field

This test measures the spontaneous locomotor activity of the animals on placement in a novel environment. The floor (1 × 1 m) is a white square in Plexiglas with walls (45 cm) made in PVC. The open field arena is thoroughly cleaned before each rat is tested. Ten weeks after their arrival, the locomotor activity of the rats was measured using the video tracking system containing an infrared video camera. Each animal was placed in the center of the apparatus and the total distance travelled by the animals was recorded during 10 min (Videotrack, Viewpoint, Lyon, France). A low light intensity (60 lux) was used to limit high anxiety levels and to obtain normal amount of exploration levels.

Spatial reference memory in the morris water maze

Rats were tested in a Morris water maze (180 cm diameter, 60 cm high) filled with water (22 ± 1°C) with a spatial reference memory protocol as previously described in Bonnet et al. (2008). Briefly, 13 weeks after their arrival, animals were required to locate a submerged platform by using distal extramaze cues. They were trained four trials a day (90 s with an intertrial interval of 60 s, starting from three different start points randomized every day) for 7 consecutive days. As the latency to reach the hidden platform

is dependent on the swimming speed, the distance covered to reach the platform is a more appropriate measure and has been chosen as a good index of the acquisition rate for spatial learning in the water maze. On day 8 (at 14 weeks of VAD), spatial memory was evaluated by the percentage of time spent in the quadrant where the platform was located during training (target quadrant). After the probe trial, on day 9, animals were trained for 4 trials to find a visible platform. Two VAD rats were excluded from the experiment due to failure to search for the platform during the acquisition phase (floating).

Elevated plus-maze

Two days after the end of the water maze, rats were tested for anxiety-like behavior in the elevated-plus maze. The elevated plus-maze apparatus consisted of two opposite open arms (50 × 10 cm) and two opposite enclosed arms (50 × 10 cm) emanating from a common central platform (10 × 10 cm) to form a plus shape. The apparatus was elevated 50 cm above the floor. The luminosity conditions were the same than that of the open-field test (60 lux). Each rat was placed on the central platform with his head facing an open arm. The anxiety-related behaviors (total time and percentage of time spent in open arms as indexes of anxiety (Walf and Frye, 2007) of all animals and their global locomotor activity were recorded for a period of 10 min by a video camera (Videotrack, Viewpoint, Lyon, France).

TISSUE PREPARATION

One day after the elevated plus maze, rats were transferred to a room adjacent to the laboratory, were euthanized with isoflurane, and decapitated within 3 min to avoid the effects of euthanasia on plasma CORT levels.

As described in **Figure 1** (experiment 1), trunk blood was collected immediately in order to measure serum retinol, plasma CORT, and CBG binding capacity. Trunk blood was then centrifuged to obtain serum samples (1500 g for 15 min) and plasma samples (1500 g for 10 min in tubes containing 10% EDTA). The supernatant was collected and stored until assay at -20°C and at -80°C respectively.

Ten brains per group were randomly assigned for later measurements: i.e., 40 for biochemical and PCR analyzes (**Figure 1**, experiment 1) and 40 for DCX immunohistochemistry (**Figure 1**, experiment 2). In order to measure hippocampal activity of 11β -HSD1 and its mRNA expression by quantitative RT-PCR and to evaluate hippocampal levels of CORT, the hippocampi from both cerebral hemispheres were rapidly removed, frozen in liquid nitrogen, and then stored at -80°C until assay. In order to analyze hippocampal neurogenesis by immunohistochemistry, the dissected brains were washed with 0.9% sodium chloride and emerged in 4% paraformaldehyde. After a 3-week postfixation period, 50 μm coronal sections were cut on a vibratome (Leica).

SERUM RETINOL

Serum retinol was assayed by HPLC according to a previously described method (Biesalski et al., 1983).

PLASMA CORT AND CBG ANALYZES

Total and free CORT levels and CBG binding capacity were measured in the same plasma samples.

Total plasma CORT concentration was measured by RIA (see Richard et al., 2010 for details). Briefly, after steroid extraction of plasma samples with absolute ethanol, total CORT was measured by competition between cold CORT and ^3H -CORT by a specific anti-CORT antibody provided by Dr H. Vaudry (University of Rouen, France). The sensitivity of this assay is around 5 ng/mL.

Free plasma CORT concentration was measured by isotopic dilution and plasma ultrafiltration using Centrifree filter device (YM membranes 30 K, Millipore, France) as in (Richard et al., 2010), using 100 μL of plasma. Free CORT fraction was calculated as the ratio of counts per minute (cpm) filtrate (free CORT)/cpm total CORT.

CBG maximum binding capacity (Bmax) and Kd were measured with a saturation curve and Scatchard analysis as described in Richard et al. (2010) using a standard curve of tritiated CORT up to 64 nM.

CORT AND 11β -HSD1 ANALYZES IN THE HIPPOCAMPUS

Half of the microdissected hippocampi was homogenized on ice in 1 mL of buffer (1.37 M Glycerol, 300 mM NaCl, 1 mM EDTA, 50 mM Tris, 1X Phosphatase Inhibitor Cocktail, 2 mM NaOV, 1 mM NaF; pH = 7.7). The total protein content of the homogenate was determined with a BC Assay kit (Uptima, Montluçon, France).

Hippocampal levels of CORT were measured by an enzyme immunoassay commercial kit (Correlate-EIA; Assay Designs, Ann Arbor, MI) from homogenates containing a final protein concentration of 6 mg/mL. This assay was chosen for his high sensitivity, allowing the detection of low levels of CORT (around 18.6 pg/mL).

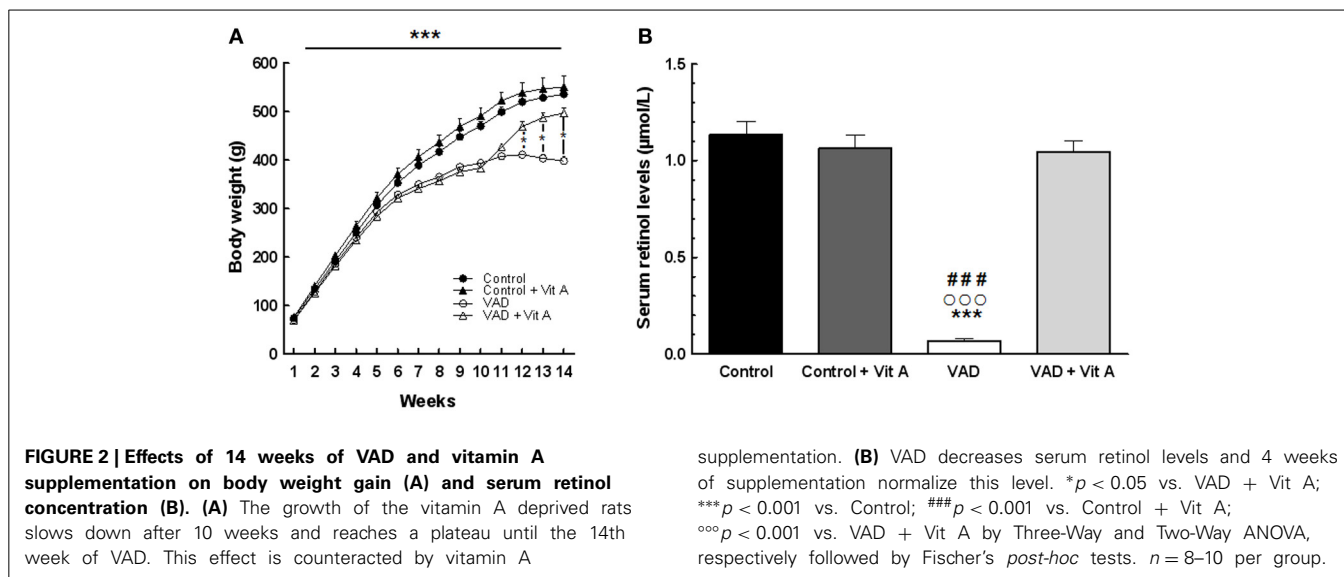
Hippocampal activity of 11β -HSD1 was also measured from the same homogenates. *In vivo*, 11β -HSD1 catalyzed the conversion of inactive 11-dehydroCORT to CORT. According to (Moisan et al., 1990), dehydrogenase activity was measured by quantifying the conversion of CORT (B) to 11-dehydroCORT (A). 0.5 mg/mL of total protein were incubated at 37°C for 1 h with 12 nM ^3H -CORT as substrate (specific activity: 78.1 Ci/mmol, PerkinElmer) and an excess (400 μM) of the enzyme-specific cofactor NADP. After incubation, steroids were extracted by addition of ethyl acetate, separated by thin-layer chromatography on silica gel plates (TLC Silica Gel 60 F254, VWR) using a mixture of chloroform and ethanol (92:8). Then, ^3H -CORT and ^3H -dehydroCORT were quantified with a β -Imager apparatus and 11β -HSD1 activity was expressed as the percentage conversion of ^3H -CORT (B) to ^3H -dehydroCORT (A).

REAL-TIME PCR ANALYZES OF RETINOID TARGET GENE EXPRESSION IN THE HIPPOCAMPUS

The other half of the hippocampi was used to measure gene expression. RNA extraction was conducted using TRIzol reagent (Invitrogen, Saint Aubin, France) according to the manufacturer's instructions. The integrity of the purified RNA was verified using the RNA 6000 Nano LabChip kit in combination with the 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). The concentrations of RNA were determined by using a Nanodrop ND-1000 (Labtech). Using oligodT and random primers (Promega, Charbonnières les bains, France), cDNA was synthesized from 1 μg of RNA with ImPromII reverse transcriptase (Promega, Charbonnières les Bains, France) according to the manufacturer protocol. The real-time PCR was performed using the LightCycler 480 system with a 96-well format (Roche Diagnostics) in a volume of 20 μL , containing 1X LightCycler 480 SYBR Green I Master solution, 0.5 μM of each primer and 6 μL of cDNA. The forward and reverse primer sequences for the 11β -HSD1 and β -microglobulin (BMG) that has been used as a house-keeping gene, was the following: 11β -HSD1-f: AAAATACCTCCTCCCCGTCCTG; 11β -HSD1-r: TCTCTTCCGATCCCTTTGCTG; BMG-f: GCC CAACTTCCTCAACTGCTACG; BMG-r: GCATATACATCGGT CTCGGTGGG. The results were expressed as the target/reference ratio divided by the target/reference ratio of the calibrator.

IMMUNOHISTOCHEMISTRY

Free-floating sections were processed with a standard immunohistochemical procedure (Lemaire et al., 2006). A one-in-ten section was treated for doublecortin (DCX) immunoreactivity using a goat polyclonal antibody (1:1000, Santa Cruz Biotechnology) and a biotinylated donkey anti-goat secondary antibody (1:200, Amersham). All sections were processed in parallel, and immunoreactivities were visualized



by the biotin-streptavidin technique (ABC kit, Dako) by using 3,3-diaminobenzidine as chromogen. The number of immunoreactive (IR) cells in the left Dentate Gyrus (DG) was estimated by using a modified version of the optical fractionators method with a systematic random sampling of every 10 sections along the rostrocaudal axis of the DG. On each section, IR cells in the granular and subgranular layers of the DG were counted with a $100\times$ microscope objective (Lemaire et al., 2006). All results were expressed as the total number of DCX-IR cells in the whole DG.

STATISTICAL ANALYSIS

Locomotor activity was analyzed by a One-Way ANOVA (effect of deficiency). Reference memory, elevated-plus maze test, DCX immunohistochemistry, biochemical, and PCR data were analyzed using a Two-Way ANOVA (effect of deficiency and supplementation) followed by a *post-hoc* Fisher PLSD test. Body weight gain, spatial learning, and swim speed data were analyzed using a Three-Way ANOVA with repeated measures (effect of deficiency, supplementation and days or weeks) followed by a *post-hoc* Fisher PLSD test. All results were expressed as mean \pm SEM.

RESULTS

EFFECTS OF VAD ON LOCOMOTOR ACTIVITY IN THE OPEN-FIELD TEST

The same diet protocol was used as in a previous study that has shown that the consumption of the vitamin A-free diet for 10 weeks induces a time course vitamin A depletion of the liver store in rats, leading to a decreased serum retinol concentration (Husson et al., 2003). The impact of vitamin A deficiency on locomotor activity in response to novelty was evaluated in the open-field test. The ANOVA on total distance revealed no significant difference between the control and VAD groups [7253.47 ± 523.59 cm vs. 7755.9 ± 546.09 cm; $F_{(1, 35)} = 2.42$, n.s.] indicating that a 10-week VAD does not induce alterations in global locomotor activity. The levels of activity scores were used to equilibrate the groups receiving or not a vitamin A supplementation (at 10 weeks, Control: 7481.9 ± 319.2 cm; Control + Vit

A: 7025.1 ± 321.8 cm; VAD: 7760.9 ± 304.8 cm; VAD + Vit A: 7751 ± 290.2 cm).

EFFECTS OF VAD AND VITAMIN A SUPPLEMENTATION ON BODY WEIGHT AND SERUM RETINOL CONCENTRATION

In order to control the vitamin A status of the animals, we measured the body weight gain over 14 weeks and the serum retinol concentration after 14 weeks of diet.

A Two-Way ANOVA on body weight over the 10 weeks of VAD revealed a highly significant effect of deficiency [$F_{(1, 35)} = 32.69$, $p < 0.001$] and a strong interaction deficiency \times weeks [$F_{(9, 315)} = 52$, $p < 0.001$]. Indeed, the **Figure 2A** indicates that the growth of the vitamin A-deprived rats reached a plateau after 10 weeks of VAD and then stabilized their body weight until the 14th week whereas control rats kept on gaining weight. However, a vitamin A supplementation during 4 weeks was sufficient to induce a significant increase of body weight in VAD rats while it did not affect the weight of control rats [Three-Way ANOVA between 11 and 14 weeks of VAD, deficiency \times supplementation \times weeks: $F_{(3, 99)} = 52.20$, $p < 0.001$]. On the 14th week, VAD rats that had been supplemented for 4 weeks had a similar weight as control rats (Fisher's *post-hoc*, $p > 0.05$, between VAD + Vit A and Controls).

The analysis of serum retinol levels was performed at 14 weeks of VAD in order to control for the vitamin A status for each group (**Figure 2B**). The ANOVA on serum retinol levels revealed a significant effect of deficiency [$F_{(1, 33)} = 88.68$, $p < 0.001$], a significant effect of supplementation [$F_{(1, 33)} = 62.47$, $p < 0.001$] with an interaction deficiency \times supplementation [$F_{(1, 33)} = 82.74$, $p < 0.001$]. A significant reduction (-90%) in serum retinol concentration was observed in VAD rats (0.069 ± 0.001 $\mu\text{mol/L}$) relative to control rats (1.133 ± 0.068 $\mu\text{mol/L}$) (Fisher's *post-hoc*, $p < 0.001$). Four weeks of a vitamin A-enriched diet restored the serum retinol level in VAD rats (1.046 ± 0.054 $\mu\text{mol/L}$) (Fisher's *post-hoc*, $p < 0.001$, between VAD and VAD + Vit A) while no effect of supplementation was observed in control rats

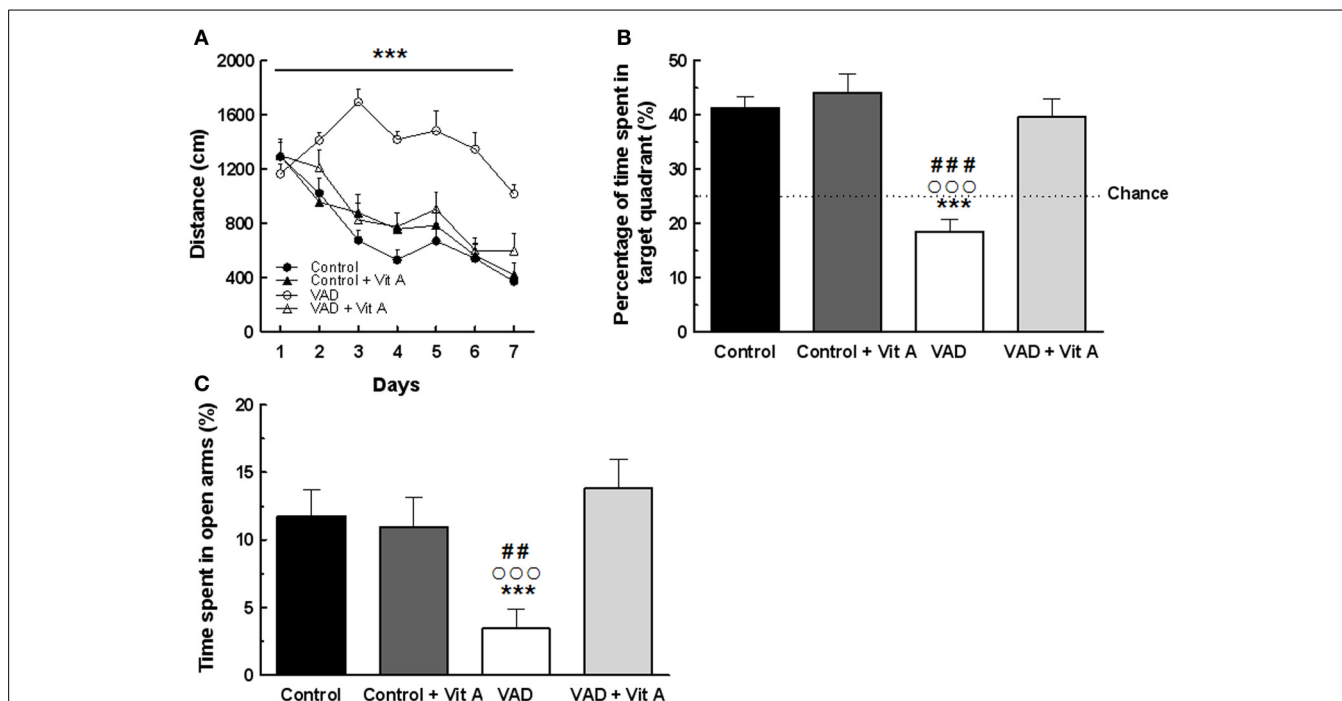


FIGURE 3 | Effects of 14 weeks of VAD and vitamin A supplementation on (A, B) spatial learning and memory and (C) anxiety-like behavior. (A) Distance covered to reach the hidden platform over the 7 consecutive days of spatial learning (spatial learning; blocks of trials for each training day are averaged). **(B)** Percentage of time spent by rats in the target quadrant (Probe test). The dotted line corresponds to chance level (25%). VAD rats exhibit longer distance compared to controls to reach the platform during acquisition and they spent a percentage

of time in the target quadrant around the chance level. The spatial learning and memory deficits are corrected by a 4-week vitamin A supplementation. **(C)** VAD decreases the percentage of time spent in open arms in plus-maze test suggesting an increased anxiety level in VAD rats which is normalized by supplementation. *** $p < 0.001$ vs. Control; ## $p < 0.01$ vs. Control + Vit A; ### $p < 0.001$ vs. Control + Vit A; °°° $p < 0.001$ vs. VAD + Vit A by Three-Way ANOVA (spatial learning) and Two-Way ANOVA followed by Fischer's *post-hoc* tests. $n = 8-10$ per group.

(Control + Vit A: $1.078 \pm 0.061 \mu\text{mol/L}$) (Fisher's *post-hoc*, $p > 0.05$, between Control and Control + Vit A).

EFFECTS OF VAD AND VITAMIN A SUPPLEMENTATION ON SPATIAL LEARNING AND MEMORY

The reference memory of rats was performed in the Morris water maze task.

A Three-Way ANOVA of the distance to reach the platform over the seven training days (Figure 3A) revealed a significant effect of deficiency. Indeed, VAD rats travelled significantly longer distance to find the hidden platform than control rats, evidencing spatial learning impairments [$F_{(1, 32)} = 29.03$, $p < 0.001$]. Interestingly, the ANOVA revealed a significant effect of supplementation [$F_{(1, 32)} = 8.97$, $p < 0.001$] with an interaction days \times deficiency \times supplementation [$F_{(6, 192)} = 3.96$, $p < 0.001$] showing that a vitamin A-enriched diet could correct learning impairments of the VAD rats. However, the vitamin A supplementation had no effect on the spatial performances of the control rats.

Twenty four hours later, their spatial memory for the platform location was evaluated using a probe test (Figure 3B). A Two-Way ANOVA was performed on the percentage of time spent in the target quadrant and revealed a significant effect of deficiency [$F_{(1, 33)} = 22.78$, $p < 0.001$], and of supplementation [$F_{(1, 33)} = 17.65$, $p < 0.001$] with an interaction deficiency

\times supplementation [$F_{(1, 33)} = 10.37$, $p < 0.001$]. Unlike control rats, VAD rats did not look for the platform in the target quadrant as indicated by a percentage of time around the chance level (25%) suggesting that VAD induces spatial memory impairments (Fisher's *post-hoc* VAD vs. Control $p < 0.001$). Interestingly, a vitamin A supplementation normalized spatial memory performances in VAD rats, looking for the platform mainly in the correct quadrant, with a percentage of time similar to that observed in control rats (Fisher's *post-hoc* VAD + Vit A vs. VAD, $p < 0.001$; VAD + Vit A vs. Control, n.s.). However, the supplementation did not improve the performances of the control group (Fisher's *post-hoc* Control + Vit A vs. Control, n.s.).

Rats from all groups performed similarly in the control version of the water maze task with a visible platform indicating that learning differences were not due to differences in motor or visual capabilities, thigmotaxic behavior, or more generally to differences in health status (data not shown).

EFFECTS OF VAD AND VITAMIN A SUPPLEMENTATION ON ANXIETY-LIKE BEHAVIOR

The influence of 14 weeks of VAD and vitamin A supplementation on anxiety-like behavior was evaluated in the elevated plus-maze (Figure 3C). A Two-Way ANOVA on the percentage of time spent in the open arms revealed an effect of supplementation

$[F_{(1, 33)} = 5.73, p < 0.05]$ with an interaction deficiency \times supplementation $[F_{(1, 33)} = 7.78, p < 0.01]$. Indeed, VAD animals spent less time in open arms (-70%) than control animals, (Fisher's *post-hoc* VAD vs. Control, $p < 0.05$) suggesting that they had higher anxiety levels but normal locomotor activity (no significant differences found on total travelled distance, data not shown). Interestingly, 4 weeks of vitamin A supplementation normalized the anxiety level of VAD rats (Fisher's *post-hoc* VAD vs. VAD + Vit A, $p < 0.001$) but had no effect on control animals (Fisher's *post-hoc* control vs. control + Vit A, n.s.).

EFFECTS OF VAD AND VITAMIN A SUPPLEMENTATION ON HIPPOCAMPAL NEUROGENESIS

The effects of retinoids on spatial memory have been proposed to be mediated, at least in part, by a modulation of hippocampal neurogenesis (Bonnet et al., 2008). As seen in **Figure 4A**, a quantitative analysis on the number of newly generated immature neurons revealed no effect of deficiency $[F_{(1, 35)} = 0.99, n.s.]$ nor supplementation $[F_{(1, 35)} = 2.4; n.s.]$ but an interaction deficiency \times supplementation $[F_{(1, 35)} = 6.14, p < 0.01]$ (**Figure 4B**). Thus, we showed that the number of DCX-IR cells was decreased in VAD rats (-25%) and this effect was compensated by a vitamin A supplementation that did not have any effect in control animals by itself (Fisher's *post-hoc* VAD vs. Control $p < 0.01$; VAD vs. VAD + Vit A $p < 0.01$, Control vs. Control + Vit A, n.s.).

EFFECTS OF VAD AND VITAMIN A SUPPLEMENTATION ON PLASMA GLUCOCORTICOID STATUS

In order to verify whether vitamin A could act through the modulation of GCs, we investigated total and free plasma CORT and we also examined the plasma CBG binding capacity involved in the regulation of free CORT levels according to the vitamin A status.

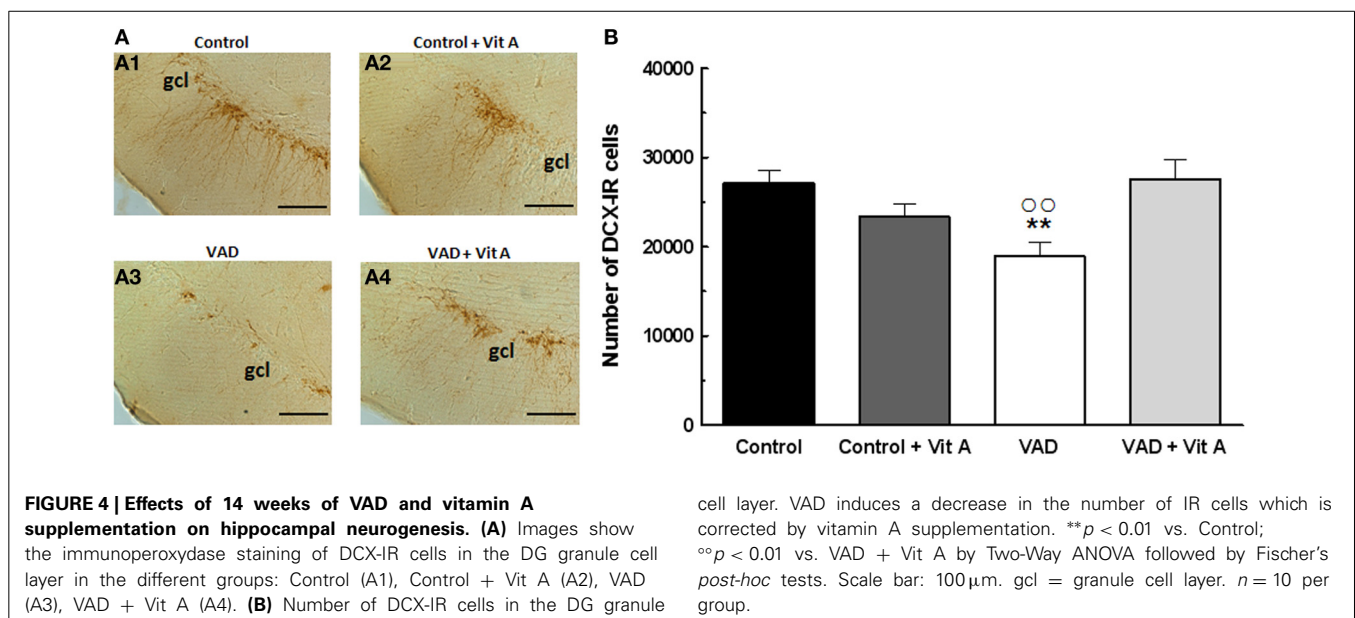
No significant differences in the total plasma CORT concentration (**Figure 5A**) were found but the ANOVA on free plasma CORT levels (**Figure 5B**) revealed a deficiency tendency

$[F_{(1, 32)} = 3.59, p = 0.06]$ and a significant supplementation effect $[F_{(1, 32)} = 4.72, p < 0.05]$ without deficiency \times supplementation interaction $[F_{(1, 32)} = 1.90, p = 0.17]$. Interestingly, the ANOVA on plasma free CORT fraction (**Figure 5C**) indicated a strong deficiency effect $[F_{(1, 32)} = 8.48, p < 0.01]$, a supplementation effect $[F_{(1, 32)} = 5.79, p < 0.05]$ with a significant deficiency \times supplementation interaction $[F_{(1, 32)} = 6.54, p = 0.01]$. Thus, free CORT fraction was increased in VAD rats ($+38\%$) compared to controls (Fisher's *post-hoc* VAD vs. Control, $p < 0.001$; VAD: $4.3 \pm 0.4\%$ > Control: $3.1 \pm 0.06\%$). The supplementation normalized the level of free CORT fraction in VAD rats (Fisher's *post-hoc* VAD vs. VAD + Vit A: $3.2 \pm 0.09\%$, $p < 0.001$), but had no effect in control rats (Fisher's *post-hoc* Control vs. Control + Vit A: $3.13 \pm 0.07\%$, n.s.).

As total circulating CORT is largely bound to CBG, we examined the importance of plasma CBG in regulating free plasma CORT under deficiency and supplementation conditions. The ANOVA on CBG Bmax concentrations (**Figure 5D**) showed significant effects of deficiency and of supplementation $[F_{(1, 32)} = 6.15, p < 0.05; F_{(1, 32)} = 13.1, p = 0.001]$, respectively with a strong deficiency \times supplementation interaction $[F_{(1, 32)} = 14.90, p < 0.001]$. Fisher's *post-hoc* analyzes, revealed that the VAD diet significantly decreased CBG Bmax (-55% ; VAD: 459.5 ± 62.4 nM vs Control: 1038 ± 99.3 nM, $p < 0.001$). Moreover, the level of CBG Bmax in VAD rats was normalized by the vitamin A supplementation (Fisher's *post-hoc* VAD vs. VAD + Vit A: 1142.61 ± 82.5 nM, $p < 0.001$) but was not modified in control rats. As observed for Bmax, the ANOVA on CBG Kd indicated significant effects (data not shown).

EFFECTS OF VAD AND VITAMIN A SUPPLEMENTATION ON HIPPOCAMPAL GLUCOCORTICOID STATUS

We explored the possibility that 14 weeks of VAD and 4 weeks of vitamin A supplementation could modulate GCs availability in the hippocampus. Thus, activity and gene expression



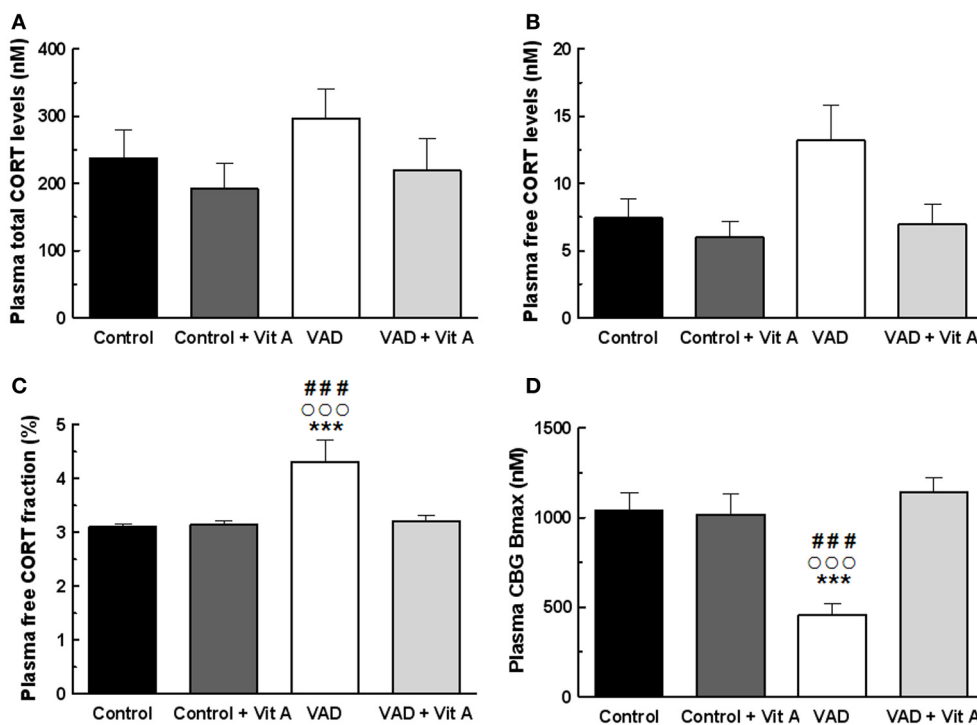


FIGURE 5 | Effects of 14 weeks of VAD and vitamin A supplementation on plasma glucocorticoid status. (A) Total **(B)** free plasma CORT levels and **(C)** free plasma CORT fraction measured by RIA. While no significant effect on total CORT levels is detected between all groups, VAD increases free CORT fraction and vitamin A supplementation restores these levels. **(D)** CBG

binding capacity measured by RIA. VAD rats exhibit lower plasma CBG Bmax compared to controls whereas vitamin A supplementation restores CBG binding capacity. *** $p < 0.001$ vs. Control; °°° $p < 0.001$ vs. VAD + Vit A; ### $p < 0.001$ vs. Control + Vit A by Two-Way ANOVA followed by Fischer's *post-hoc* tests. $n = 9$ per group.

of 11β -HSD1 but also CORT levels were studied in the hippocampus.

The activity of 11β -HSD1 within the hippocampus was not affected by the deficiency (**Figure 6A**). [$F_{(1,29)} = 1.81$, n.s.] nor by the supplementation [$F_{(1,29)} = 1.39$, n.s.] but there was a significant deficiency \times supplementation interaction [$F_{(1,29)} = 5.28$, $p < 0.05$]. Indeed, the activity of 11β -HSD1 was significantly increased in VAD rats (Fisher's *post-hoc* VAD vs. Control $p < 0.05$; VAD: $43.7 \pm 2.5\%$ > control: $33 \pm 3.2\%$) and was normalized by vitamin A supplementation (Fisher's *post-hoc* VAD vs. VAD + Vit A $p < 0.05$; VAD: $43.7 \pm 2.5\%$ > VAD + Vit A: $33.5 \pm 2.9\%$). However, this supplementation did not have any effect in control rats (Fisher's *post-hoc* Control vs. Control + vit A, n.s.). Thus, we checked whether this increased 11β -HSD1 activity in VAD rats could be due to an increase in mRNA expression. The ANOVA on hippocampal mRNA expression of 11β -HSD1 (**Figure 6B**) showed a deficiency effect indicating an increased level of 11β -HSD1 mRNA expression in rats submitted to VAD compared to control rats [$F_{(1,29)} = 6.52$, $p = 0.01$]. Moreover, the vitamin A supplementation tended to decrease the levels of 11β -HSD1 expression in the hippocampus [$F_{(1,29)} = 3.59$, $p = 0.06$].

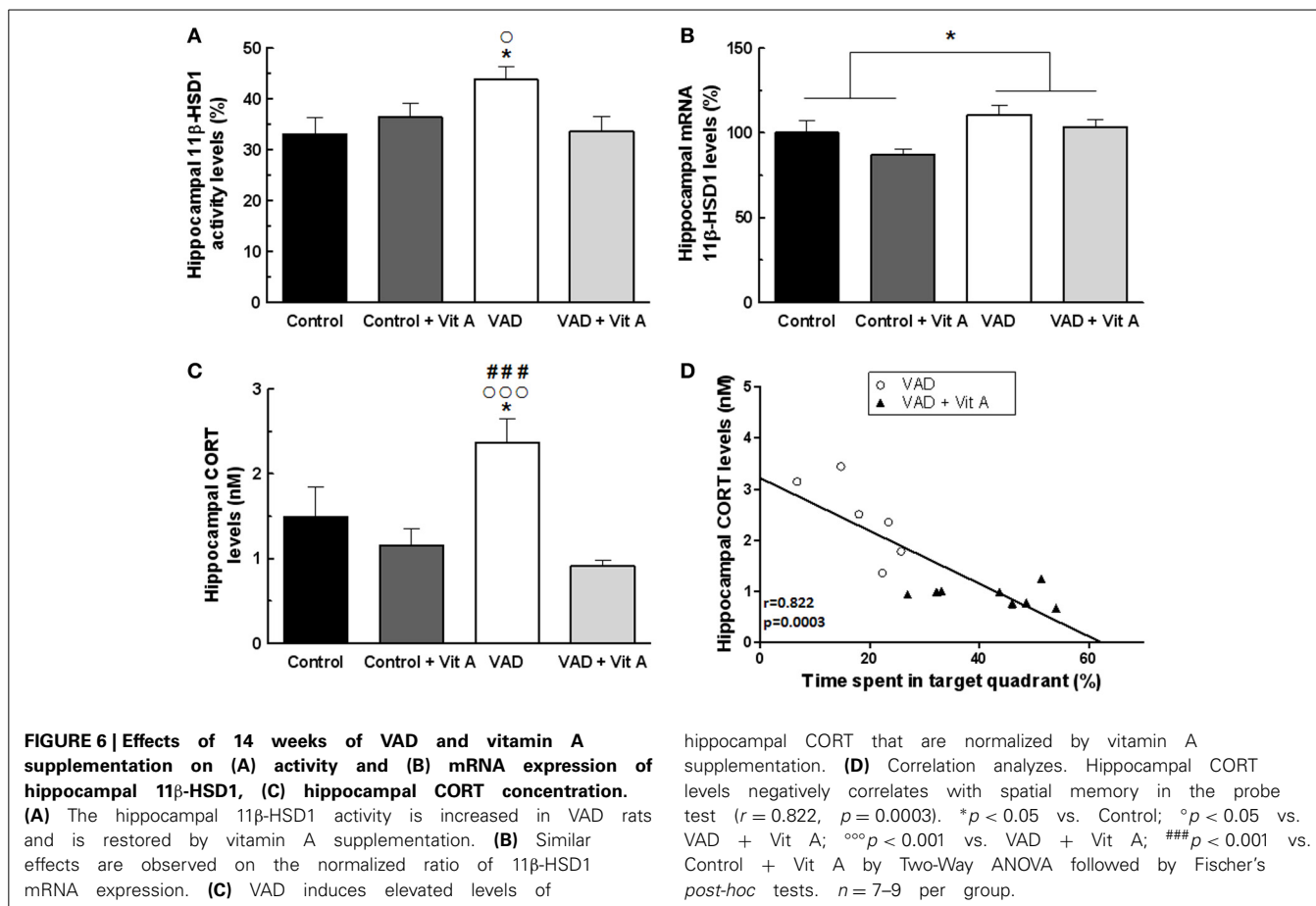
As 11β -HSD1 catalyses the regeneration of active GCs within cells, we measured CORT levels in the hippocampus (**Figure 6C**). Whereas no effect of deficiency was observed, [$F_{(1,29)} = 1.61$, n.s.], the ANOVA revealed a significant supplementation effect

[$F_{(1,29)} = 12.85$, $p = 0.001$] and a deficiency \times supplementation interaction [$F_{(1,29)} = 5.04$, $p < 0.05$] suggesting that VAD rats have a significant elevation of hippocampal CORT levels (+53.9%) compared to controls (Fisher's *post-hoc* VAD vs. Control $p < 0.001$; VAD: 2.37 ± 0.28 nM > Control: 1.49 ± 0.34 nM). Interestingly, the vitamin A supplementation normalized these CORT levels in VAD rats (Fisher's *post-hoc* VAD vs. VAD + Vit A $p < 0.001$; VAD: 2.37 ± 0.28 nM > VAD + Vit A: 0.91 ± 0.06 nM) but had no effect in control rats (Fisher's *post-hoc* Control vs. Control + Vit A $p < 0.001$; Control: 1.49 ± 0.34 nM \approx Control + Vit A: 1.16 ± 0.19 nM).

As shown in **Figure 6D**, there was a strong negative correlation between hippocampal CORT levels and spatial memory ($r = 0.82$, $p < 0.001$) suggesting that the higher the level of hippocampal CORT, the poorer the spatial memory of the rats.

DISCUSSION

Our data demonstrate for the first time that vitamin A status can regulate GCs availability at both peripheral and hippocampal levels. Thus, the excess of free plasma and hippocampal CORT in VAD rats, which is associated with a decreased binding capacity of plasma CBG and a hyperactivity of hippocampal 11β -HSD1, could contribute to the appearance of spatial memory deficits, elevated anxiety-like behavior and hippocampal neurogenesis alterations observed after 14 weeks of VAD. Interestingly, such effects could be limited by a 4-week vitamin A supplementation.



VITAMIN A STATUS REGULATES PLASMA CORT LEVELS THROUGH CBG BINDING CAPACITY

Prolonged exposure to elevated GCs during life has been hypothesized to contribute to the decline of hippocampal plasticity and functions (Cameron and Gould, 1994; Lupien et al., 1998; Yau and Seckl, 2012). It has recently been found that CBG would play a critical role in the deliverance of GCs to the brain by impacting on memory retrieval (Breuner and Orchinik, 2002; Minni et al., 2012). Indeed, CBG acts as a buffer of most systemic GCs by limiting the amount of circulating free hormones that are active on their receptors (Moisan, 2010; Richard et al., 2010). In order to better understand the mechanisms by which the hippocampal availability of GCs could be modulated by vitamin A status, we have studied total plasma CORT levels, free plasma CORT levels and CBG binding capacity, measured under resting conditions (in the morning). Neither a vitamin A deficient diet nor a vitamin A supplemented diet affects total plasma CORT levels. On the contrary, free plasma CORT levels is modulated by vitamin A status with a significant effect on free plasma CORT fraction, higher in VAD rats compared to controls and normalized by a vitamin A supplementation. Moreover, our data suggest that the increased free plasma CORT levels in VAD rats can be directly related to the decreased CBG binding capacity. This link is reinforced by data on vitamin A supplementation that appeared efficient in normalizing both effects. Thus, these results evidence an antagonistic effect of vitamin A on plasma GCs status.

The effects of VAD on plasma GCs status has been recently reported by our team in LOU/C rats (Arvy et al., 2013) that are derived from the Wistar strain and described as a model of healthy ageing with decreased age-related memory deficits (Alliot et al., 2002). Indeed, an increase in HPA axis activity has been shown in VAD LOU/C rats leading to elevated total plasma CORT levels in basal and stress conditions, which were restored by RA treatment (Arvy et al., 2013). We have shown that VAD in Wistar rats can increase HPA axis activity leading to hypersecretion of basal free plasma CORT level that is normalized by a vitamin A supplementation. Moreover, total or free plasma CORT level of the control rats are not affected by the vitamin A supplementation. On the contrary, it has been shown that long term RA treatment induced a hyperactivation of HPA axis accompanied with increased basal plasma CORT levels in young Sprague Dawley rats (Cai et al., 2010). This discrepancy may be related to differences in the treatment used (RA injections vs. food supplementation) and the nutritional status (deficient rats vs. control rats). Indeed, chronic injections of high doses of RA are known to induce alterations in hippocampal plasticity and functions in young animals with a normal vitamin A status (Crandall et al., 2004). The nutritional intake of vitamin A in our young control rats does not modify serum retinol concentration, known to be tightly regulated. In our nutritional conditions, RA would be physiologically provided to the tissues. Thus, we can suggest that the counteracting effects of the supplemented diet on free plasma CORT levels

would be efficient only in animals exhibiting a decreased vitamin A status with a retinoid hypo-signaling.

VITAMIN A STATUS REGULATES HIPPOCAMPAL CORT LEVELS THROUGH 11 β -HSD1 ACTIVITY

Here, we demonstrate for the first time that vitamin A supplementation can counteract the elevation of hippocampal CORT levels in VAD rats, probably by normalizing the activity and expression of hippocampal 11 β -HSD1. We have shown previously that vitamin A status can induce a modulation of GCs at systemic levels which probably impact on the hippocampal availability of GCs (Yau and Seckl, 2012). The magnitude of intracellular GCs action is also thought to be determined by the activity of 11 β -HSDs (Seckl, 1997). Indeed, 11 β -HSD1 regenerates active GCs from their inactive forms, in specific areas in the adult brain, such as the hippocampus, thereby effectively amplifying intracellular GC levels before they bind to MRs and/or GRs (Holmes et al., 2003). Our results show that VAD diet induces a hyperactivity of the hippocampal 11 β -HSD1, probably resulting from gene overexpression since the amount of 11 β -HSD1 mRNA increased in VAD rats. Moreover, the increased activity of this enzyme is associated with elevated hippocampal CORT concentration suggesting an amplification of GCs signaling pathway in VAD rats. Interestingly, these effects on hippocampal 11 β -HSD1 and local levels of CORT in VAD rats are abolished by a vitamin A supplementation suggesting that this enriched diet could exert an inhibitory effect on GCs hippocampal signaling pathway. Consistent with these findings, it has been shown that RA treatment can reduce both the gene expression and the activity of 11 β -HSD1 in C2C12 myotubes (Aubry and Odermatt, 2009). Moreover, the vitamin A supplementation can normalize elevated hepatic levels of 11 β -HSD1 in obese rats (Sakamuri et al., 2011) and the overexpression of hippocampal 11 β -HSD1 in VAD LOU/C rats (Arvy et al., 2013). These effects of vitamin A status on hippocampal 11 β -HSD1 could directly be mediated through nuclear retinoid receptors, that have been shown to regulate negatively 11 β -HSD1 expression *in vitro* models (Aubry and Odermatt, 2009). Thus, since VAD induces a decrease in brain mRNA expression and immunoreactivity of some retinoid receptors (Husson et al., 2004; Arfaoui et al., 2013), the overexpression of 11 β -HSD1 in vitamin A deficient rats could result from this regulatory mechanism.

DOES VITAMIN A STATUS IMPACT ON HIPPOCAMPAL PLASTICITY AND FUNCTIONS VIA GLUCOCORTICOIDS?

Vitamin A and its active metabolite RA, act on memory processes by modulating different aspects of hippocampal plasticity (Etchamendy et al., 2001, 2003; Cocco et al., 2002; Mingaud et al., 2008) including hippocampal neurogenesis (Jacobs et al., 2006; Bonnet et al., 2008; Goodman et al., 2012; Touyarot et al., 2013). We also show that a nutritional approach could be as effective as a pharmacological treatment (Bonnet et al., 2008) to correct spatial memory deficits and hippocampal neurogenesis alterations induced by VAD. Thus, in VAD enriched rats, the newly absorbed vitamin A from diet may be directly used by extra-hepatic tissue such as the brain (Ross et al., 2009) to increase local synthesis of RA which would allow to normalize

retinoid signaling and to maintain normal hippocampal plasticity and functions. Interestingly, we have also evidenced a negative correlation between hippocampal CORT levels and spatial memory: the higher the hippocampal CORT levels, the poorer the spatial memory performance, suggesting that the excess of local GCs could result in memory deficits in VAD rats. Thus, this result sustains the hypothesis that GCs signaling pathway could mediate the deleterious effects of VAD on hippocampal plasticity and functions.

Consistent with our findings, higher plasma cortisol or CORT levels is associated with spatial memory impairments in humans and rodents, respectively (Issa et al., 1990; Yau et al., 1995; Lupien et al., 1998). Moreover, aged mice exhibiting an overactivation of 11 β -HSD1 (Yau et al., 1995; Yau and Seckl, 2012) show similar memory impairments as our VAD rats. The involvement of 11 β -HSD1 in age-induced memory deficits has been demonstrated in 11 β -HSD1 KO mice (Yau et al., 2001, 2007) or by decreasing the activity of the enzyme using selective inhibitors (Sooy et al., 2010; Mohler et al., 2011). The improved spatial memory in aged 11 β -HSD1 KO mice has been proposed to occur via reduced intracellular CORT levels altering the balance of corticoid receptor activation (Yau et al., 2011). Moreover, in aged animals and in VAD LOU/C rats hippocampal expression of GR is decreased, leading to alterations of hippocampus-induced negative feedback on HPA axis and an increased plasma CORT levels in these animals (Mizoguchi et al., 2009; Arvy et al., 2013). Since CORT concentration in target tissues as the hippocampus results from (i) free plasma CORT produced by HPA axis and (ii) local CORT synthesis by 11 β -HSD1 (Yau and Seckl, 2012), both the normalization of hippocampal 11 β -HSD1 activity and free plasma CORT fraction by vitamin A supplementation, could contribute to the correction of VAD-induced memory deficits. Finally, we show that VAD rats with spatial memory deficits are more anxious than control rats, and that vitamin A supplementation normalizes this anxiety trait. According to our results, the alteration of vitamin A status by chronic injections of high doses of RA has been shown to induce an increased plasma CORT level that has been associated with increased anxiety in the elevated plus maze (Cai et al., 2010). Thus, a normal vitamin A status would allow to maintain hippocampus-dependent memory integrity but also anxiety-related responses probably through a tight control of the CORT availability in the hippocampus.

Besides, excess of GCs are known to strongly inhibit adult hippocampal neurogenesis (Cameron and Gould, 1994; Gould and Tanapat, 1999). Vitamin A supplementation may thus limit their negative effects and maintain normal neurogenesis. Indeed, the suppression of GCs secretion from mid-life by adrenalectomy increases neurogenesis in old animals and prevents the emergence of age-related memory disorders (Montaron et al., 2006). Moreover, 11 β -HSD1 is particularly expressed in the DG and increased hippocampal neurogenesis has been found in young 11 β -HSD1 KO mice (Yau et al., 2007). Thus, the beneficial effects of a vitamin A supplementation on VAD-induced neurogenesis decline could be partly mediated by hippocampal GCs pathway. This hypothesis has been also comforted by the fact that RA minimizes the potentially deleterious effect of GCs on the decreased secretion of BDNF in hippocampal HT22 cells (Brossaud et al.,

2013), a neurotrophin known to stimulate adult neurogenesis processes and to be involved in the reduction of neurogenesis during chronic exposure to GCs (Duman and Monteggia, 2006). Finally, glutamatergic mechanisms are thought to be also involved in stress-induced changes of hippocampal neurogenesis (Joels et al., 2004; Hunter et al., 2009). As it has been shown recently that VAD could alter hippocampal glutamatergic transmission (Zhang et al., 2011; Jiang et al., 2012), all of these endpoints provide potential targets for novel treatment strategies of chronic GCs-induced hippocampal plasticity alterations by nutritional factors.

Considerable progress has been made in controlling VAD worldwide (Bloem et al., 2002) and fortification programs have been shown repeatedly to be an effective food-based strategy to improve Vitamin A status (Souganidis et al., 2013). Our data show that a vitamin A supplementation could act on biochemical and molecular parameters but also cerebral plasticity and cognitive functions. However, we cannot exclude the possibility that a control diet with a lower vitamin A content would also be efficient to correct the observed deleterious effects of VAD. Indeed, future investigations and additional prevention efforts are still needed to better determine the dietary forms and/or the doses of vitamin A.

CONCLUSION

Altogether, the present study demonstrates for the first time a modulation of hippocampal CORT availability by the vitamin A status. Indeed, the vitamin A supplementation normalizes the excess of CORT in VAD rats, (i) at the plasma level by regulating free CORT fraction and CBG binding capacity but also (ii) at the hippocampal level probably through a modulation of 11 β -HSD1 activity. Moreover, the strong negative correlation found between the hippocampal CORT levels and the spatial memory performances suggests that the modulation of hippocampal CORT availability by the vitamin A status could be a neurobiological mechanism by which the retinoid pathway impacts on hippocampal neurogenesis and functions. Since same alterations of vitamin A metabolism and GCs availability occur during aging, this study supports the idea that a vitamin A supplementation could be a potent way to prevent age-related cognitive impairments by maintaining normal vitamin A and GCs status in seniors.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceived and designed the experiments: Damien Bonhomme, Véronique Pallet, Paul Higuieret and Katia Touyarot. Performed the experiments: Damien Bonhomme, Amandine M. Minni, Serge Alfes, Emmanuel Richard and Pascale Roux. Analyzed the data: Damien Bonhomme, Amandine M. Minni and Katia Touyarot. Wrote the paper: Damien Bonhomme, Amandine M. Minni, Marie-Pierre Moisan, Véronique Pallet and Katia Touyarot.

ACKNOWLEDGMENTS

This work has been supported by the Conseil Régional d'Aquitaine. The authors would like to thank Rachel Hamiani, Mathieu Cadet, and Philippe Birac for animal care, Nicole Barthe and Brigitte Brouilleau for their advices concerning β -Imager

apparatus. We also are grateful to Julien Bensalem, Fabrice Casenave, and Pauline Lafenêtre for their technical contribution.

REFERENCES

- Alliot, J., Boghossian, S., Jourdan, D., Veyrat-Durebex, C., Pickering, G., Meynial-Denis, D., et al. (2002). The LOU/c/jall rat as an animal model of healthy aging? *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 57, B312–B320. doi: 10.1093/gerona/57.8.B312
- Arfaoui, A., Lobo, M. V., Boulbaroud, S., Ouichou, A., Mesfioui, A., and Arenas, M. I. (2013). Expression of retinoic acid receptors and retinoid X receptors in normal and vitamin A deficient adult rat brain. *Ann. Anat.* 195, 111–121. doi: 10.1016/j.aanat.2012.06.006
- Arvy, N., Hamiani, R., Richard, E., Moisan, M. P., and Pallet, V. (2013). Vitamin A regulates HPA axis status in LOU/C rats. *J. Endocrinol.* 219, 21–27. doi: 10.1530/JOE-13-0062
- Aubry, E. M., and Odermatt, A. (2009). Retinoic acid reduces glucocorticoid sensitivity in C2C12 myotubes by decreasing 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and glucocorticoid receptor activities. *Endocrinology* 150, 2700–2708. doi: 10.1210/en.2008-1618
- Biesalski, H. K., Ehrenthal, W., Gross, M., Hafner, G., and Harth, O. (1983). Rapid determination of retinol (vitamin A) in serum by high pressure liquid chromatography (HPLC). *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 53, 130–137.
- Bloem, M. W., Kiess, L., and Moench-Pfanner, R. (2002). Process indicators for monitoring and evaluating vitamin A programs. *J. Nutr.* 132, 2934S–2939S.
- Bonnet, E., Touyarot, K., Alfes, S., Pallet, V., Higuieret, P., and Abrous, D. N. (2008). Retinoic acid restores adult hippocampal neurogenesis and reverses spatial memory deficit in vitamin A deprived rats. *PLoS ONE* 3:e3487. doi: 10.1371/journal.pone.0003487
- Breuner, C. W., and Orchinik, M. (2002). Plasma binding proteins as mediators of corticosteroid action in vertebrates. *J. Endocrinol.* 175, 99–112. doi: 10.1677/joe.0.1750099
- Brossaud, J., Roumes, H., Moisan, M. P., Pallet, V., Redonnet, A., and Corcuff, J. B. (2013). Retinoids and glucocorticoids target common genes in hippocampal HT22 cells. *J. Neurochem.* 125, 518–531. doi: 10.1111/jnc.12192
- Cai, L., Yan, X. B., Chen, X. N., Meng, Q. Y., and Zhou, J. N. (2010). Chronic all-trans retinoic acid administration induced hyperactivity of HPA axis and behavioral changes in young rats. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 20, 839–847. doi: 10.1016/j.euroneuro.2010.06.019
- Cameron, H. A., and Gould, E. (1994). Adult neurogenesis is regulated by adrenal steroids in the dentate gyrus. *Neuroscience* 61, 203–209. doi: 10.1016/0306-4522(94)90224-0
- Cocco, S., Diaz, G., Stancampiano, R., Diana, A., Carta, M., Curreli, R., et al. (2002). Vitamin A deficiency produces spatial learning and memory impairment in rats. *Neuroscience* 115, 475–482. doi: 10.1016/S0306-4522(02)00423-2
- Crandall, J., Sakai, Y., Zhang, J., Koul, O., Mineur, Y., Crusio, W. E., et al. (2004). 13-cis-retinoic acid suppresses hippocampal cell division and hippocampal-dependent learning in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 5111–5116. doi: 10.1073/pnas.0306336101
- de Kloet, E. R., Joels, M., and Holsboer, F. (2005). Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 463–475. doi: 10.1038/nrn1683
- Duman, R. S., and Monteggia, L. M. (2006). A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol. Psychiatry* 59, 1116–1127. doi: 10.1016/j.biopsych.2006.02.013
- Eichenbaum, H. (2004). Hippocampus: cognitive processes and neural representations that underlie declarative memory. *Neuron* 44, 109–120. doi: 10.1016/j.neuron.2004.08.028
- Eichenbaum, H., Dudchenko, P., Wood, E., Shapiro, M., and Tanila, H. (1999). The hippocampus, memory, and place cells: is it spatial memory or a memory space? *Neuron* 23, 209–226. doi: 10.1016/S0896-6273(00)80773-4
- Etchamendy, N., Enderlin, V., Marighetto, A., Pallet, V., Higuieret, P., and Jaffard, R. (2003). Vitamin A deficiency and relational memory deficit in adult mice: relationships with changes in brain retinoid signalling. *Behav. Brain Res.* 145, 37–49. doi: 10.1016/S0166-4328(03)00099-8
- Etchamendy, N., Enderlin, V., Marighetto, A., Vouimba, R. M., Pallet, V., Jaffard, R., et al. (2001). Alleviation of a selective age-related relational memory deficit in mice by pharmacologically induced normalization of brain retinoid signaling. *J. Neurosci.* 21, 6423–6429.

- Goodman, T., Crandall, J. E., Nanesco, S. E., Quadro, L., Shearer, K., Ross, A., et al. (2012). Patterning of retinoic acid signaling and cell proliferation in the hippocampus. *Hippocampus* 22, 2171–2183. doi: 10.1002/hipo.22037
- Gould, E., and Tanapat, P. (1999). Stress and hippocampal neurogenesis. *Biol. Psychiatry* 46, 1472–1479. doi: 10.1016/S0006-3223(99)00247-4
- Holmes, M. C., Carter, R. N., Noble, J., Chitnis, S., Dutia, A., Paterson, J. M., et al. (2010). 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression is increased in the aged mouse hippocampus and parietal cortex and causes memory impairments. *J. Neurosci.* 30, 6916–6920. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0731-10.2010
- Holmes, M. C., Yau, J. L., Kotelevtsev, Y., Mullins, J. J., and Seckl, J. R. (2003). 11 Beta-hydroxysteroid dehydrogenases in the brain: two enzymes two roles. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1007, 357–366. doi: 10.1196/annals.1286.035
- Hunter, R. G., Bellani, R., Bloss, E., Costa, A., McCarthy, K., and McEwen, B. S. (2009). Regulation of kainate receptor subunit mRNA by stress and corticosteroids in the rat hippocampus. *PLoS ONE* 4:e4328. doi: 10.1371/journal.pone.0004328
- Husson, M., Enderlin, V., Alfos, S., Boucheron, C., Pallet, V., and Huguieret, P. (2004). Expression of neurogranin and neuromodulin is affected in the striatum of vitamin A-deprived rats. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 123, 7–17. doi: 10.1016/j.molbrainres.2003.12.012
- Husson, M., Enderlin, V., Alfos, S., Feart, C., Huguieret, P., and Pallet, V. (2003). Triiodothyronine administration reverses vitamin A deficiency-related hypoxpression of retinoic acid and triiodothyronine nuclear receptors and of neurogranin in rat brain. *Br. J. Nutr.* 90, 191–198. doi: 10.1079/BJN2003877
- Issa, A. M., Rowe, W., Gauthier, S., and Meaney, M. J. (1990). Hypothalamic-pituitary-adrenal activity in aged, cognitively impaired and cognitively unimpaired rats. *J. Neurosci.* 10, 3247–3254.
- Jacobs, S., Lie, D. C., Decicco, K. L., Shi, Y., Deluca, L. M., Gage, F. H., et al. (2006). Retinoic acid is required early during adult neurogenesis in the dentate gyrus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 3902–3907. doi: 10.1073/pnas.0511294103
- Jiang, W., Yu, Q., Gong, M., Chen, L., Wen, E. Y., Bi, Y., et al. (2012). Vitamin A deficiency impairs postnatal cognitive function via inhibition of neuronal calcium excitability in hippocampus. *J. Neurochem.* 121, 932–943. doi: 10.1111/j.1471-4159.2012.07697.x
- Joels, M., Karst, H., Alfarez, D., Heine, V. M., Qin, Y., van Riel, E., et al. (2004). Effects of chronic stress on structure and cell function in rat hippocampus and hypothalamus. *Stress* 7, 221–231. doi: 10.1080/10253890500070005
- Joels, M., and Krugers, H. J. (2007). LTP after stress: up or down? *Neural Plast.* 2007, 93202. doi: 10.1155/2007/93202
- Klempin, F., and Kempermann, G. (2007). Adult hippocampal neurogenesis and aging. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 257, 271–280. doi: 10.1007/s00406-007-0731-5
- Krugers, H. J., Lucassen, P. J., Karst, H., and Joels, M. (2010). Chronic stress effects on hippocampal structure and synaptic function: relevance for depression and normalization by anti-glucocorticoid treatment. *Front. Synaptic Neurosci.* 2:24. doi: 10.3389/fnsyn.2010.00024
- Lane, M. A., and Bailey, S. J. (2005). Role of retinoid signalling in the adult brain. *Prog. Neurobiol.* 75, 275–293. doi: 10.1016/j.pneurobio.2005.03.002
- Lemaire, V., Lamarque, S., Le Moal, M., Piazza, P. V., and Abrous, D. N. (2006). Postnatal stimulation of the pups counteracts prenatal stress-induced deficits in hippocampal neurogenesis. *Biol. Psychiatry* 59, 786–792. doi: 10.1016/j.biopsych.2005.11.009
- Lupien, S. J., de Leon, M., de Santi, S., Convit, A., Tarshish, C., Nair, N. P., et al. (1998). Cortisol levels during human aging predict hippocampal atrophy and memory deficits. *Nat. Neurosci.* 1, 69–73. doi: 10.1038/271
- Magarinos, A. M., and McEwen, B. S. (1995). Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: involvement of glucocorticoid secretion and excitatory amino acid receptors. *Neuroscience* 69, 89–98. doi: 10.1016/0306-4522(95)00259-L
- Marill, J., Idres, N., Capron, C. C., Nguyen, E., and Chabot, G. G. (2003). Retinoic acid metabolism and mechanism of action: a review. *Curr. Drug Metab.* 4, 1–10. doi: 10.2174/1389200033336900
- McCaffery, P., Zhang, J., and Crandall, J. E. (2006). Retinoic acid signaling and function in the adult hippocampus. *J. Neurobiol.* 66, 780–791. doi: 10.1002/neu.20237
- McEwen, B. S. (1999). Stress and hippocampal plasticity. *Annu. Rev. Neurosci.* 22, 105–122. doi: 10.1146/annurev.neuro.22.1.105
- Mingaud, F., Mormede, C., Etchamendy, N., Mons, N., Niedergang, B., Wietrzyk, M., et al. (2008). Retinoid hypsignaling contributes to aging-related decline in hippocampal function in short-term/working memory organization and long-term declarative memory encoding in mice. *J. Neurosci.* 28, 279–291. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4065-07.2008
- Minni, A. M., Dorey, R., Pierard, C., Dominguez, G., Helbling, J. C., Foury, A., et al. (2012). Critical role of plasma corticosteroid-binding-globulin during stress to promote glucocorticoid delivery to the brain: impact on memory retrieval. *Endocrinology* 153, 4766–4774. doi: 10.1210/en.2012-1485
- Misner, D. L., Jacobs, S., Shimizu, Y., de Urquiza, A. M., Solomin, L., Perlmann, T., et al. (2001). Vitamin A deprivation results in reversible loss of hippocampal long-term synaptic plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 11714–11719. doi: 10.1073/pnas.191369798
- Mizoguchi, K., Ikeda, R., Shoji, H., Tanaka, Y., Maruyama, W., and Tabira, T. (2009). Aging attenuates glucocorticoid negative feedback in rat brain. *Neuroscience* 159, 259–270. doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.12.020
- Mohler, E. G., Browman, K. E., Roderwald, V. A., Cronin, E. A., Markosyan, S., Scott Bitner, R., et al. (2011). Acute inhibition of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type-1 improves memory in rodent models of cognition. *J. Neurosci.* 31, 5406–5413. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4046-10.2011
- Moisan, M. P. (2010). Genotype-phenotype associations in understanding the role of corticosteroid-binding globulin in health and disease animal models. *Mol. Cell. Endocrinol.* 316, 35–41. doi: 10.1016/j.mce.2009.07.017
- Moisan, M. P., Seckl, J. R., and Edwards, C. R. (1990). 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase bioactivity and messenger RNA expression in rat forebrain: localization in hypothalamus, hippocampus, and cortex. *Endocrinology* 127, 1450–1455. doi: 10.1210/endo-127-3-1450
- Montaron, M. F., Drapeau, E., Dupret, D., Kitchener, P., Arousseau, C., Le Moal, M., et al. (2006). Lifelong corticosterone level determines age-related decline in neurogenesis and memory. *Neurobiol. Aging* 27, 645–654. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2005.02.014
- Oitzl, M. S., and de Kloet, E. R. (1992). Selective corticosteroid antagonists modulate specific aspects of spatial orientation learning. *Behav. Neurosci.* 106, 62–71. doi: 10.1037/0735-7044.106.1.62
- Olson, C. R., and Mello, C. V. (2010). Significance of vitamin A to brain function, behavior and learning. *Mol. Nutr. Food Res.* 54, 489–495. doi: 10.1002/mnfr.200900246
- Paez-Pereda, M., Kovalovsky, D., Hopfner, U., Theodoropoulou, M., Pagotto, U., Uhl, E., et al. (2001). Retinoic acid prevents experimental Cushing syndrome. *J. Clin. Invest.* 108, 1123–1131. doi: 10.1172/JCI11098
- Richard, E. M., Helbling, J. C., Tridon, C., Desmedt, A., Minni, A. M., Cador, M., et al. (2010). Plasma transcortin influences endocrine and behavioral stress responses in mice. *Endocrinology* 151, 649–659. doi: 10.1210/en.2009-0862
- Ross, A. C., Russell, R. M., Miller, S. A., Munro, I. C., Rodricks, J. V., Yetley, E. A., et al. (2009). Application of a key events dose-response analysis to nutrients: a case study with vitamin A (retinol). *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 49, 708–717. doi: 10.1080/10408390903098749
- Sakamuri, V. P., Ananthmakula, P., Veetil, G. N., and Ayyalasomayajula, V. (2011). Vitamin A decreases pre-receptor amplification of glucocorticoids in obesity: study on the effect of vitamin A on 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity in liver and visceral fat of WNTN/Ob obese rats. *Nutr. J.* 10, 70. doi: 10.1186/1475-2891-10-70
- Sandi, C. (2003). [Glucocorticoid involvement in memory consolidation]. *Rev. Neurol.* 37, 843–848.
- Sandi, C., Cordero, M. I., Merino, J. J., Kruyt, N. D., Regan, C. M., and Murphy, K. J. (2004). Neurobiological and endocrine correlates of individual differences in spatial learning ability. *Learn. Mem.* 11, 244–252. doi: 10.1101/lm.73904
- Seckl, J. R. (1997). 11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase in the brain: a novel regulator of glucocorticoid action? *Front. Neuroendocrinol.* 18, 49–99. doi: 10.1006/frne.1996.0143
- Sooy, K., Webster, S. P., Noble, J., Binnie, M., Walker, B. R., Seckl, J. R., et al. (2010). Partial deficiency or short-term inhibition of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 improves cognitive function in aging mice. *J. Neurosci.* 30, 13867–13872. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2783-10.2010
- Souganidis, E., Laillou, A., Leyvraz, M., and Moench-Pfanner, R. (2013). A comparison of retinyl palmitate and red palm oil beta-carotene as strategies to address Vitamin A deficiency. *Nutrients* 5, 3257–3271. doi: 10.3390/nu5083257
- Sousa, N., Lukoyanov, N. V., Madeira, M. D., Almeida, O. F., and Paula-Barbosa, M. M. (2000). Reorganization of the morphology of hippocampal neurites and synapses after stress-induced damage correlates with behavioral improvement. *Neuroscience* 97, 253–266. doi: 10.1016/S0306-4522(00)00050-6

- Touyarot, K., Bonhomme, D., Roux, P., Alfos, S., Lafenetre, P., Richard, E., et al. (2013). A mid-life vitamin A supplementation prevents age-related spatial memory deficits and hippocampal neurogenesis alterations through CRABP-I. *PLoS ONE* 8:e72101. doi: 10.1371/journal.pone.0072101
- Walf, A. A., and Frye, C. A. (2007). The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat. Protoc.* 2, 322–328. doi: 10.1038/nprot.2007.44
- Yau, J. L., McNair, K. M., Noble, J., Brownstein, D., Hibberd, C., Morton, N., et al. (2007). Enhanced hippocampal long-term potentiation and spatial learning in aged 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 knock-out mice. *J. Neurosci.* 27, 10487–10496. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2190-07.2007
- Yau, J. L., Noble, J., Kenyon, C. J., Hibberd, C., Kotelevtsev, Y., Mullins, J. J., et al. (2001). Lack of tissue glucocorticoid reactivation in 11beta -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 knockout mice ameliorates age-related learning impairments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 4716–4721. doi: 10.1073/pnas.071562698
- Yau, J. L., Noble, J., and Seckl, J. R. (2011). 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 deficiency prevents memory deficits with aging by switching from glucocorticoid receptor to mineralocorticoid receptor-mediated cognitive control. *J. Neurosci.* 31, 4188–4193. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6145-10.2011
- Yau, J. L., Olsson, T., Morris, R. G., Meaney, M. J., and Seckl, J. R. (1995). Glucocorticoids, hippocampal corticosteroid receptor gene expression and antidepressant treatment: relationship with spatial learning in young and aged rats. *Neuroscience* 66, 571–581. doi: 10.1016/0306-4522(94)00612-9
- Yau, J. L., and Seckl, J. R. (2012). Local amplification of glucocorticoids in the aging brain and impaired spatial memory. *Front. Aging Neurosci.* 4:24. doi: 10.3389/fnagi.2012.00024
- Yau, S. Y., Lau, B. W., Zhang, E. D., Lee, J. C., Li, A., Lee, T. M., et al. (2012). Effects of voluntary running on plasma levels of neurotrophins, hippocampal cell proliferation and learning and memory in stressed rats. *Neuroscience* 222, 289–301. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.07.019
- Zhang, M., Huang, K., Zhang, Z., Ji, B., Zhu, H., Zhou, K., et al. (2011). Proteome alterations of cortex and hippocampus tissues in mice subjected to vitamin A depletion. *J. Nutr. Biochem.* 22, 1003–1008. doi: 10.1016/j.jnutbio.2010.08.012

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 12 September 2013; accepted: 13 January 2014; published online: 04 February 2014.

Citation: Bonhomme D, Minni AM, Alfos S, Roux P, Richard E, Higuieret P, Moisan M-P, Pallet V and Touyarot K (2014) Vitamin A status regulates glucocorticoid availability in Wistar rats: consequences on cognitive functions and hippocampal neurogenesis? *Front. Behav. Neurosci.* 8:20. doi: 10.3389/fnbeh.2014.00020

This article was submitted to the journal *Frontiers in Behavioral Neuroscience*.

Copyright © 2014 Bonhomme, Minni, Alfos, Roux, Richard, Higuieret, Moisan, Pallet and Touyarot. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

CARACTÉRISATION COMPORTEMENTALE APPROFONDIE DU MODÈLE DE CARENCE EN VITAMINE A

I. Introduction

Dans l'article précédent, nous décrivons un lien entre la voie de signalisation des rétinoïdes et celle des glucocorticoïdes. Ainsi, nous avons observé une augmentation de la voie d'activité des glucocorticoïdes chez les animaux carencés en vitamine A et ce, associé à des déficits mnésiques. En revanche, à l'heure actuelle, le (ou les) mécanisme(s) par le(s)quel(s) le statut en vitamine A module l'activité des glucocorticoïdes reste non élucidé.

L'une des pistes possible concerne les interactions entre les rétinoïdes et la 11 β -HSD1. En effet, plusieurs études dont la notre, observent une inhibition de l'activité de l'enzyme par les rétinoïdes (Aubry and Odermatt, 2009; Sakamuri et al., 2011; Arvy et al., 2013). Par ailleurs, de manière intéressante, il a été montré que la diminution de son activité (par l'invalidation de son gène ou par son inhibition sélective) pouvait avoir des effets bénéfiques sur la mémoire hippocampo-dépendante (Yau et al., 2001; Yau et al., 2007; Sooy et al., 2010; Holmes et al., 2010). Afin d'éprouver cette hypothèse, nous proposons d'utiliser un inhibiteur spécifique de la 11 β -HSD1 chez l'animal carencé et d'évaluer les conséquences sur les processus d'apprentissage et de mémoire hippocampo-dépendants.

Dans ce contexte, il nous est apparu important de mieux caractériser le comportement des animaux carencés et de valider notre modèle dans d'autres tests de mémoire hippocampo-dépendants présentant une phase d'acquisition plus rapide que dans le paradigme du labyrinthe aquatique de Morris.

II. Méthodologie

En collaboration avec le Dr M. Wolff (INCIA), nous avons testé l'effet d'une carence en vitamine A de 10 semaines sur l'activité locomotrice basale et sur l'activité exploratoire. Puis, nous avons testé l'effet d'une supplémentation en vitamine A intermédiaire (2 semaines) sur la mémoire hippocampo-dépendante dans un test de conditionnement de peur au contexte (CFC). Enfin, l'effet d'une supplémentation en vitamine A plus longue (4 semaines) sur la mémoire hippocampo-dépendante a été évalué dans le labyrinthe en Y (*Figure 25*).

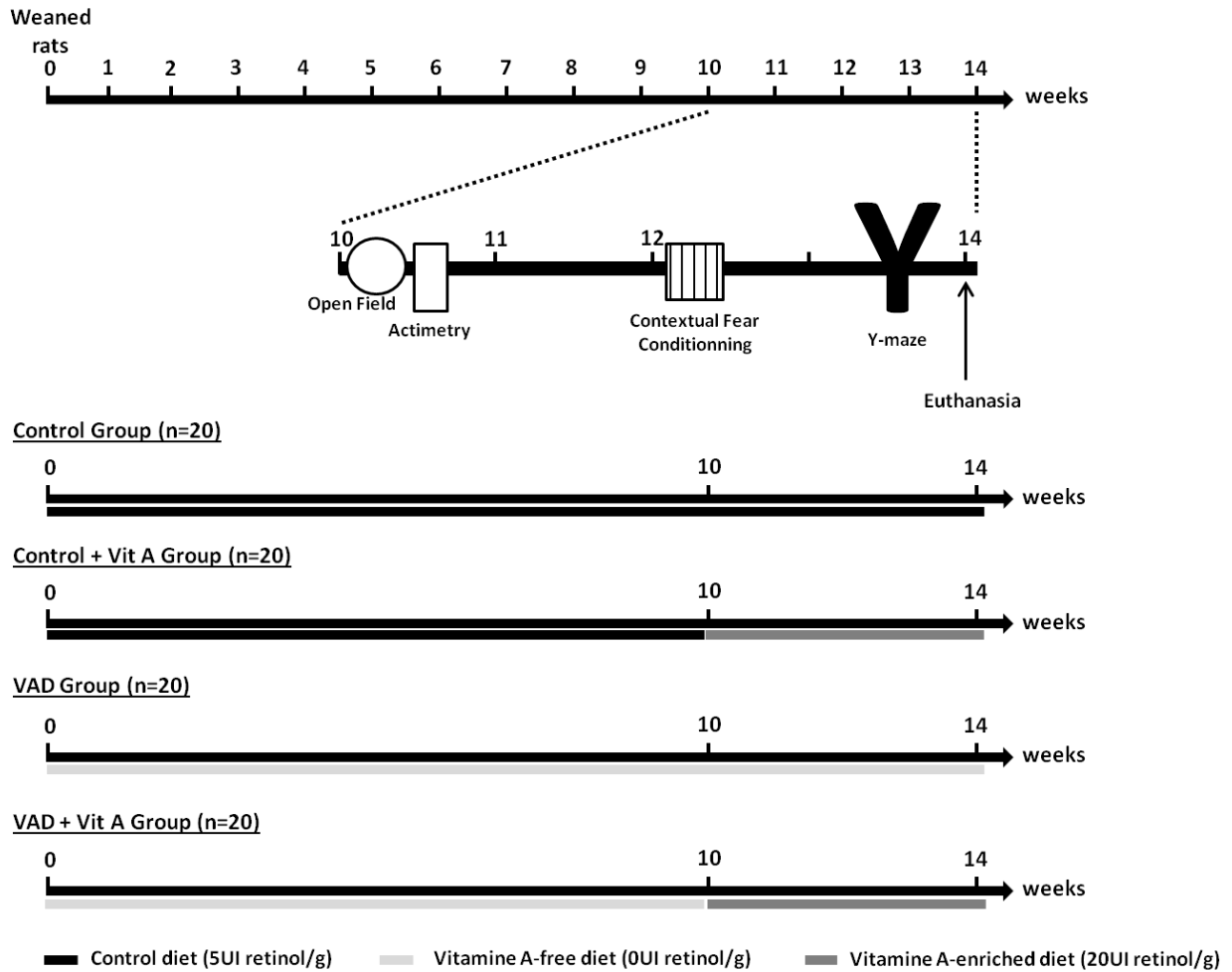


Figure 25 : Protocole expérimental mis en œuvre.

III. Résultats

III.1. Effet d'une carence en vitamine A de 10 semaines sur l'activité locomotrice basale

L'effet de 10 semaines de régime carencé en vitamine A sur l'activité locomotrice basale des animaux a été évalué pendant 1h dans des cages d'actimétrie après 10 semaines de régime (Figure 26). L'ANOVA en mesures répétées ne révèle aucun effet global de la carence [$F(1,39)=0,62$; n.s.], un effet du temps [$F(11,429)=68,77$; $p<0,0001$] mais pas d'interaction carence x temps [$F(11,429)=0,37$; n.s.]. Ces résultats attestent qu'au cours du test, l'activité locomotrice basale des animaux diminue progressivement, et ce, indépendamment de leur

régime alimentaire. Par ailleurs, ils ne révèlent aucun déficit locomoteur chez les animaux carencés.

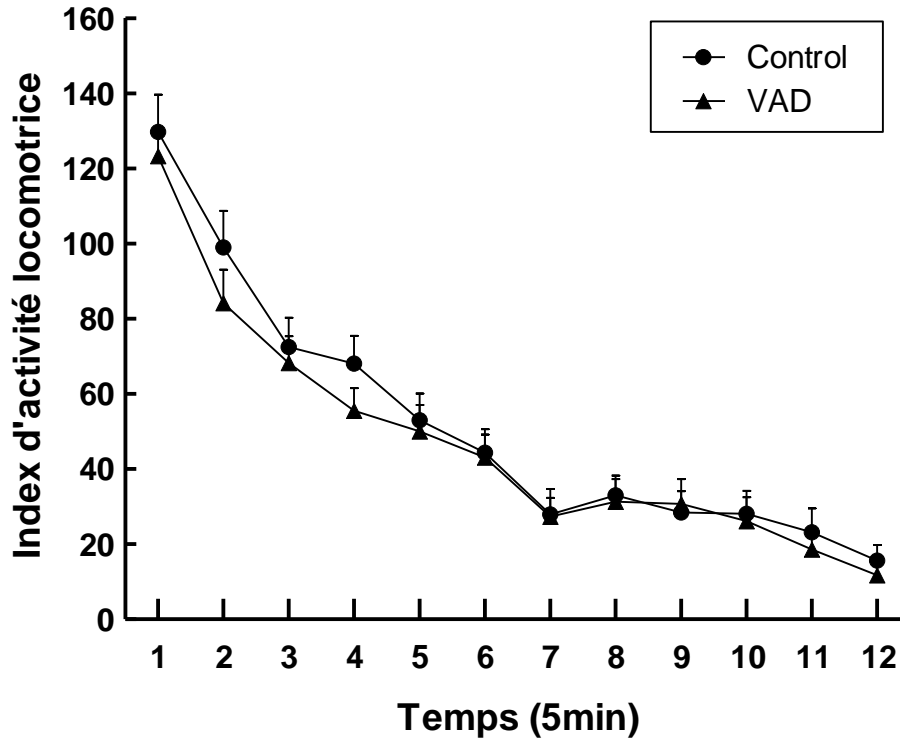


Figure 26 : Effet du statut en vitamine A sur l'activité locomotrice basale. Représente l'index d'activité locomotrice au cours du temps. Chaque graduation représente l'activité des animaux durant 5min.

III.2. Effet d'une carence en vitamine A de 10 semaines sur l'activité exploratoire

L'effet de 10 semaines de régime carencé en vitamine A sur l'activité exploratoire des animaux a été évalué pendant 10min dans un openfield après 10 semaines de régime (Figure 27).

L'ANOVA en mesures répétées sur la totalité du test (10min) révèle un effet global de la carence [$F(1,38)=4,21$; $p<0,05$], un effet du temps [$F(9,342)=11,69$; $p<0,0001$] et une interaction carence x temps [$F(9,342)=2,08$; $p<0,05$]. Ces données montrent (i) une activité globale plus élevée chez les animaux carencés en vitamine A (VAD vs Control ; $600,84 \pm$

16,80cm > 509,49 ± 12,19cm) (ii) une diminution de l'activité exploratoire au cours du temps et (iii) une évolution différente de l'activité exploratoire des animaux au cours du temps.

Par ailleurs, une analyse plus fine sur les 5 premières minutes (1 à 5min) du test montre un effet plus important de la carence [$F(1,38)=5,90$; $p<0,05$], du temps [$F(4,152)=2,44$; $p<0,0001$] mais également de l'interaction carence x temps [$F(4,152)=3,80$; $p<0,01$]. Ces statistiques attestent d'une forte augmentation globale de l'activité exploratoire des animaux carencés au début du test (VAD 681,63 ± 23,89cm > Control 557,58 ± 15,33cm) mais également d'une différence importante dans l'évolution des 2 groupes au cours du temps.

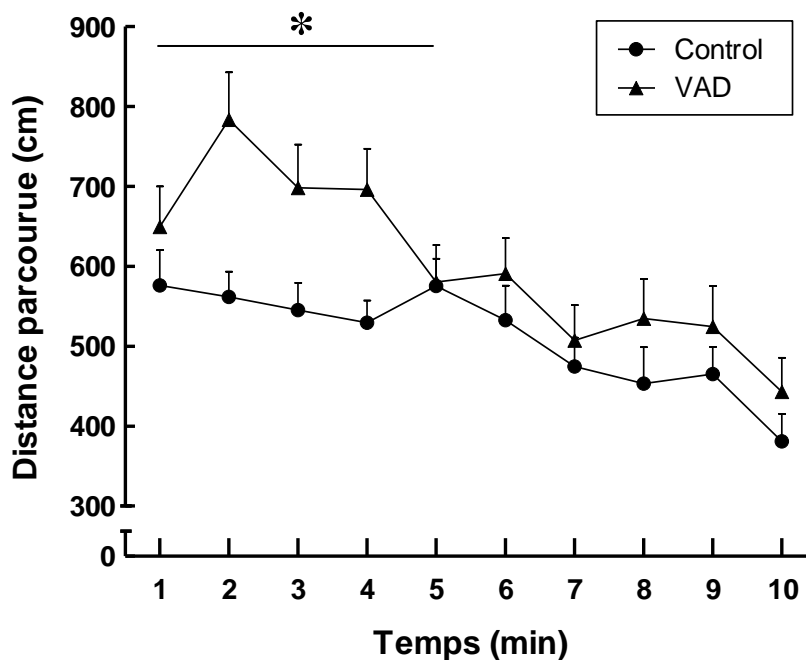


Figure 27 : Effet du statut en vitamine A sur l'activité exploratoire. Représente l'activité exploratoire au cours du temps. Chaque graduation représente l'activité des animaux durant 1min. * $p<0,05$ effet de la carence.

En revanche, l'analyse ANOVA en mesures répétées sur les 5 dernières minutes du test (6 à 10min) ne montre pas d'effet de la carence [$F(1,38)=1,67$; n.s.], un effet du temps [$F(4,152)=5,30$; $p<0,001$] mais pas d'interaction carence x temps [$F(4,152)=0,14$; n.s.]. Ces statistiques ne révèlent pas de différence dans l'activité exploratoire globale entre les 2 groupes en ne considérant que les 5 dernières minutes du test (VAD 520,05 ± 20,95cm = Control 461,39 ± 17,71cm), ni dans l'évolution de cette activité au cours du temps.

III.3. Effet d'une carence en vitamine A de 12 semaines et d'une supplémentation en vitamine A de 2 semaines sur la mémoire de peur conditionnée au contexte

Dans ce paradigme, nous avons évalué l'effet d'une supplémentation intermédiaire en vitamine A (2 semaines) sur la mémoire hippocampo-dépendante. Les animaux ont tout d'abord été conditionnés au contexte. L'ANOVA de cette phase montre que le pourcentage d'immobilité de tous les animaux augmente au cours du temps (données non montrées) comme en atteste l'effet temps [$F(7,256)=61,89$, $p<0,0001$] suggérant ainsi qu'ils ont tous été conditionnés. Un jour après la fin de la phase d'acquisition, les animaux sont replacés dans la même chambre que lors de la phase d'acquisition. Le pourcentage d'immobilité des animaux durant les 5 premières minutes du test a été calculé.

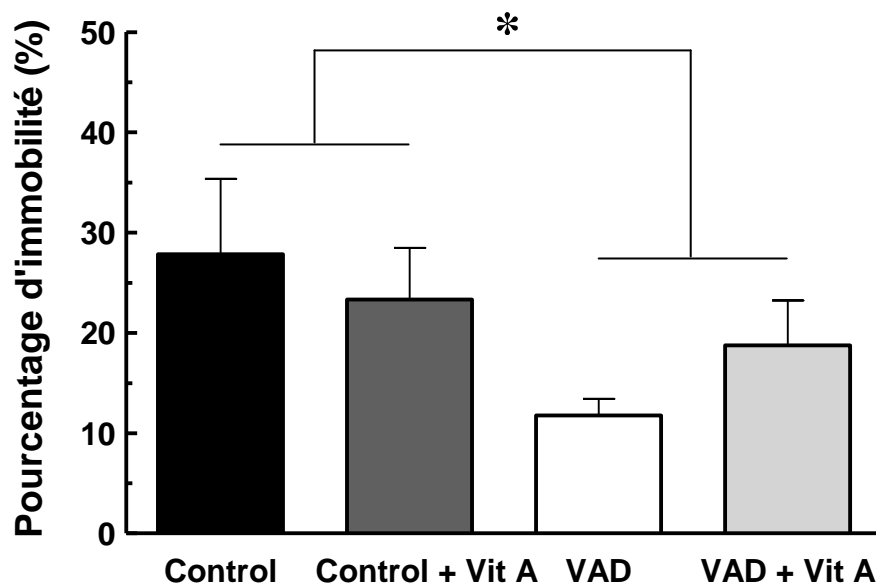


Figure 28 : Effet du statut en vitamine A sur le conditionnement de peur au contexte.

Représente le pourcentage d'immobilité des animaux au cours des 5 premières minutes du test. * $p<0,05$ effet de la carence.

Les résultats correspondant à ce test sont présentés dans la *Figure 28*. L'ANOVA à 2 facteurs révèle un effet de la carence [$F(1,37)=4,20$; $p<0,05$], pas d'effet de la supplémentation [$F(1,37)=0,06$; n.s.] et pas d'interaction carence x supplémentation [$F(1,37)=1,30$; n.s.]. Ces résultats confirment la présence d'un déficit de mémoire hippocampo-dépendant chez les animaux carencés dès la 12^{ème} semaine de carence. Ils

attestent également que la supplémentation en vitamine A de seulement 2 semaines n'est pas suffisante pour améliorer de manière significative les performances des animaux.

Le lendemain du test au contexte, les animaux ont été testés au son afin de vérifier qu'ils ont bien été conditionnés de la même manière à savoir fortement au contexte et peu au son (données non montrées). L'analyse ANOVA du test au son ne montre pas d'effet global de la carence [$F(1,37)=0,83$; n.s.], pas d'effet global de la supplémentation [$F(1,37)=0,02$; n.s.] et pas d'interaction carence x supplémentation [$F(1,37)=1,20$; n.s.] attestant ainsi que les différences observées dans le test au contexte sont bien dues à un déficit de mémoire hippocampo-dépendant.

III.4. Effet d'une carence en vitamine A de 14 semaines et d'une supplémentation en vitamine A de 4 semaines sur la mémoire spatiale hippocampo-dépendante évaluée dans la labyrinthe en Y

Les conséquences d'une carence en vitamine A plus longue (14 semaines) et d'une supplémentation en vitamine A de 4 semaines ont été évaluées dans un test de mémoire hippocampo-dépendant, le labyrinthe en Y.

L'ANOVA à 2 facteurs du pourcentage de 1^{er} choix correct (*Figure 29 A*) ne révèle pas d'effet de la carence [$F(1,42)=1,12$; n.s.], pas d'effet de la supplémentation [$F(1,42)=1,76$; n.s.] et pas d'interaction carence x supplémentation [$F(1,42)=0,19$; n.s.]. En revanche, l'analyse univarié (Test Student un groupe) montre que le pourcentage de 1^{er} choix correct pour les animaux carencés en vitamine A n'est pas différent du hasard (VAD, $61,54 \pm 14,04\%$ $p=0,42$) contrairement aux trois autres groupes (Control, $80,00 \pm 13,33\%$ $p<0,05$; Control + Vit A, $90,91 \pm 9,91\%$ $p<0,01$; VAD + Vit A $83,33 \pm 11,24\%$ $p<0,05$).

L'analyse de variance à 2 facteurs du pourcentage de temps passé (*Figure 29 B*) dans le nouveau bras ne révèle pas d'effet de la carence [$F(1,42)=2,01$; n.s.], pas d'effet de la supplémentation [$F(1,42)=0,55$; n.s.] et pas d'interaction carence x supplémentation [$F(1,42)=1,84$; n.s.]. En revanche, l'analyse univarié (Test Student un groupe) montre que le pourcentage de temps passé dans le nouveau bras pour les animaux carencés en vitamine A et les contrôles supplémentés en vitamine A n'est pas différent du hasard (VAD, $48,17 \pm 4,71\%$ $p=0,70$ n.s. ; Control + Vit A, $57,98 \pm 6,62\%$ $p=0,26$ n.s.) contrairement aux deux autres groupes (Control, $60,72 \pm 2,46\%$ $p<0,05$; VAD + Vit A $57,69 \pm 2,80\%$ $p<0,05$).

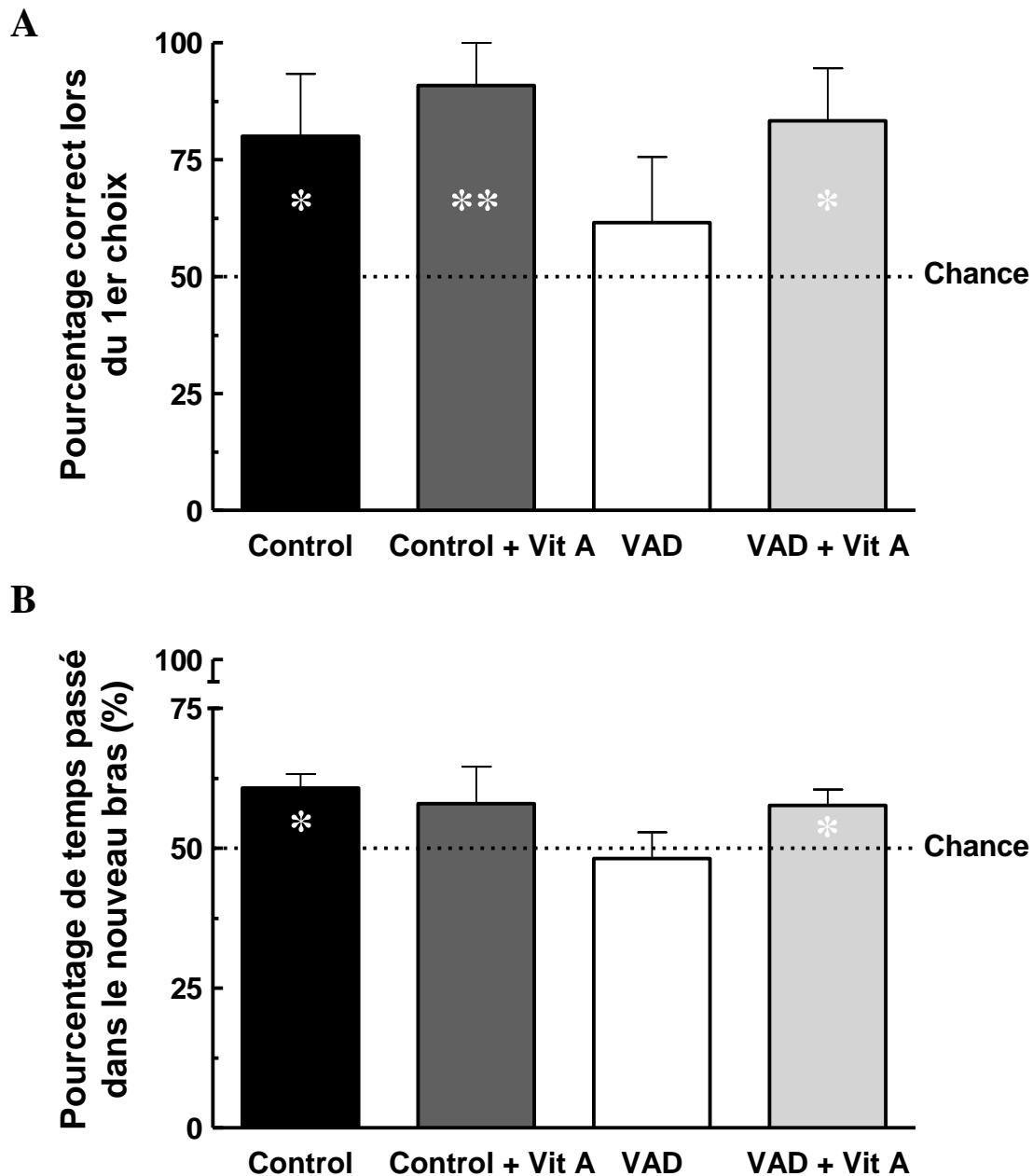


Figure 29 : Effet du statut en vitamine A sur la mémoire spatiale. A.Représente le pourcentage de choix correct lors du 1^{er} choix. B.Représente le pourcentage de temps passé dans le nouveau bras. * $p < 0,05$ par rapport au hasard (50%), ** $p < 0,01$ par rapport au hasard.

IV. Conclusion, Perspectives

Dans cette étude, nous confirmons, dans deux nouveaux paradigmes comportementaux nécessitant l'intégrité de l'hippocampe, les déficits de mémoire observés en labyrinthe aquatique de Morris chez les animaux carencés en vitamine A. Par ailleurs, de manière

intéressante, nous montrons qu'une carence de seulement 12 semaines est suffisante pour induire ces déficits de mémoire. En revanche, une supplémentation nutritionnelle de seulement 2 semaines n'a montré qu'une restauration partielle de ces altérations. Le test d'activité locomotrice basale réalisé après 10 semaines de carence montre que les animaux ne présentent aucun déficit locomoteur. Ceci suggère que le pourcentage d'immobilité plus faible observé dans le test du conditionnement de peur au contexte ne peut en aucun cas être attribué à une hyperactivité locomotrice des animaux carencés. Enfin, l'activité exploratoire évaluée à 10 semaines des animaux carencés apparaît plus élevée que celle des animaux témoins. Cette observation renforce l'idée que les déficits de mémoire observés dans le labyrinthe en Y ne peuvent pas être imputés à un déficit d'activité exploratoire des animaux dans un nouvel environnement.

Cette étude nous a permis de valider deux nouveaux tests de mémoire hippocampo-dépendants dont les phases d'acquisition et de test s'avèrent plus rapides que dans le labyrinthe aquatique de Morris. Elle nous offre donc des perspectives intéressantes dans l'optique de tester l'effet d'un traitement aigu d'un inhibiteur de la 11 β -HSD1 sur les performances mnésiques chez l'animal carencé.

PARTIE II

EFFET D'UNE SUPPLÉMENTATION EN VITAMINE A OU D'UN TRAITEMENT PAR L'ACIDE RÉTINOÏQUE SUR LA VOIE D'ACTIVITÉ DES GLUCOCORTICOÏDES ET CONSÉQUENCES SUR LA PLASTICITÉ SYNAPTIQUE ET LES PROCESSUS MNÉSQUES AU COURS DU VIEILLISSEMENT

I. Introduction

La carence vitaminique A est un modèle nutritionnel utilisé dans le laboratoire pour générer chez l'animal une hypoexpression de la voie de signalisation des rétinoïdes, comparable à celle observée au cours du vieillissement. De plus, il est maintenant bien établi que l'hypoactivité de la voie de signalisation des rétinoïdes participe au déclin des fonctions mnésiques hippocampo-dépendantes chez l'animal âgé (Etchamendy et al., 2001; Mingaud et al., 2008). En effet, des résultats obtenus dans notre laboratoire montrent que l'hypoexpression des récepteurs nucléaires des rétinoïdes s'accompagne d'une baisse d'expression de deux protéines impliquées dans la plasticité synaptique : RC3 et GAP43. En revanche, l'administration d'AR chez l'animal âgé induit une augmentation de l'expression de ces protéines synaptiques associée à une restauration des capacités mnésiques. Des investigations complémentaires ont permis de proposer que la neurogenèse hippocampique, autre aspect de la plasticité cérébrale, pouvaient également contribuer aux troubles cognitifs chez les animaux âgés présentant une hypoactivité de la voie des rétinoïdes. Ainsi, nous avons montré les effets bénéfiques d'une supplémentation nutritionnelle en vitamine A, intervenant dès le milieu de la vie, sur la préservation des capacités mnésiques du sujet âgé (voir préambule de ce chapitre) qui pourrait passer par une stimulation de certains processus de neurogenèse hippocampique (Touyarot et al., 2013).

Par ailleurs, d'autres données suggèrent qu'un dysfonctionnement de la voie des glucocorticoïdes participerait également au déclin cognitif lié à l'âge (Mizoguchi et al., 2009; Yau and Seckl, 2012). En particulier, des travaux intéressants réalisés par l'équipe du Dr D.Béracochéa ont permis de mettre en évidence une corrélation entre des niveaux élevés de glucocorticoïdes intra-hippocampiques et les processus de mémoire dépendants de l'hippocampe dans le test du CSD (Contextual Serial Discrimination task) permettant la détection précoce des déficits mnésiques liés au vieillissement (Celierier et al., 2004; Beracochea et al., 2008a; Beracochea et al., 2008b; Chauveau et al., 2009b; Chauveau et al.,

2009a; Pierard et al., 2009). Ainsi, il a été montré que la capacité des souris à mémoriser correctement cette tâche hippocampo-dépendante était corrélée négativement à la concentration intra-hippocampique en corticostérone (Chauveau et al., 2010; Tronche et al., 2010).

De plus, dans le chapitre précédent nous avons montré qu'une carence en vitamine A entraînait une hyperactivation de la voie des glucocorticoïdes se traduisant par une hypersécrétion de corticostérone au niveau périphérique mais également par une hyperactivation de la 11 β -HSD1 au niveau hippocampique, qui pourrait contribuer à l'apparition des déficits de mémoire hippocampo-dépendante. D'autre part, une supplémentation nutritionnelle en vitamine A chez les animaux carencés normalise les effets délétères observés sur la voie des glucocorticoïdes et supprime les altérations de plasticité cérébrale ainsi que les déficits mnésiques. Ces résultats contribuent à un ensemble de données cohérentes concernant les effets antagonistes de la voie des rétinoïdes sur celle des glucocorticoïdes.

Dans ce contexte, notre hypothèse de travail suggère qu'une supplémentation en vitamine A ou un traitement par l'AR adapté permettrait de maintenir l'action inhibitrice de la voie de signalisation des rétinoïdes sur celle des glucocorticoïdes, s'opposant ainsi à leurs effets délétères sur les processus neurobiologiques et cognitifs au cours du vieillissement. Ainsi, nous avons vérifié si à un âge intermédiaire (14 mois) des possibilités d'intervention pharmacologique ou nutritionnelle persistent pour corriger des déficits mnésiques mis en évidence précocement dans le test du CSD (Contextual Serial Discrimination, en collaboration avec le Dr D.Béracochea (INCIA)) et si ces effets pourraient passer par une modulation de la voie d'activité des glucocorticoïdes.

II. Méthodologie

Dans une première expérience, nous avons comparé l'efficacité d'une supplémentation nutritionnelle en vitamine A de 2 mois par rapport à celle d'un traitement par l'AR (150 μ g/kg) 4 jours avant le début des tests comportementaux sur la mémoire contextuelle hippocampo-dépendante chez la souris âgée de 14 mois. Les animaux sont ensuite sacrifiés et des analyses de l'expression des gènes de plasticité hippocampique (RC3, GAP-43, PSD-95, synaptophysine) ont été effectuées. Dans une seconde expérience, nous avons évalué la

capacité du traitement par l'AR à moduler la libération de corticostérone intrahippocampique (par microdialyse) en condition basale et après l'induction d'un stress d'exploration (dans un open-field similaire au dispositif comportemental du CSD). L'expression hippocampique des récepteurs aux rétinoïdes (RARs) ainsi que de la 11 β -HSD1 a été évaluée.

III. Principaux résultats

Nos résultats montrent tout d'abord que les 2 approches, nutritionnelle et pharmacologique permettent d'améliorer la mémoire contextuelle dépendante de l'hippocampe évaluée dans le test du CSD. En revanche, le traitement par l'AR semble plus efficace que la supplémentation en vitamine A. De plus, nous montrons que l'amélioration des performances chez les souris d'âge intermédiaire traitées par l'AR est associée à une augmentation de l'expression hippocampique de PSD-95, protéine impliquée dans les processus de plasticité synaptique. Dans la seconde expérience, nos résultats montrent qu'un traitement par l'AR permet de diminuer et de retarder la libération de corticostérone intrahippocampique induite par un stress. De plus, les niveaux de corticostérone intrahippocampique ont été associés à des variations dans l'expression hippocampique des récepteurs à l'acide rétinoïque. Enfin il semblerait, que les effets du traitement par l'AR sur les niveaux de corticostérone intrahippocampique ne passeraient pas par une modulation de la 11 β -HSD1.

IV. Conclusion

Ces résultats renforcent l'idée d'un effet antagoniste de la voie de signalisation des rétinoïdes sur celle des glucocorticoïdes. Par ailleurs, nous pouvons supposer que le fait de stimuler la voie des rétinoïdes précocement au cours du vieillissement permettrait de diminuer les effets délétères d'un dysfonctionnement de la voie des glucocorticoïdes sur certains processus de plasticité cérébrale et sur la mémoire dépendante de l'hippocampe. Ces données offrent des nouvelles perspectives intéressantes dans la prévention du déclin cognitif chez le sujet âgé. Ce travail a fait l'objet d'une publication acceptée dans **Frontiers in Aging Neuroscience**.

A Mid-Life Vitamin A Supplementation Prevents Age-Related Spatial Memory Deficits and Hippocampal Neurogenesis Alterations through CRABP-I

Katia Touyarot^{1,2*}, Damien Bonhomme^{1,2}, Pascale Roux^{1,2}, Serge Alfos^{1,2}, Pauline Lafenêtre^{1,2}, Emmanuel Richard³, Paul Higuere^{1,2}, Véronique Pallet^{1,2}

1 Univ. Bordeaux, Nutrition et Neurobiologie Intégrée, UMR 1286, Bordeaux, France, **2** INRA, Nutrition et Neurobiologie Intégrée, UMR 1286, Bordeaux, France, **3** INSERM, Transfert de gènes à visée thérapeutique dans les cellules souches, U1035, Bordeaux, France

Abstract

Age-related memory decline including spatial reference memory is considered to begin at middle-age and coincides with reduced adult hippocampal neurogenesis. Moreover, a dysfunction of vitamin A hippocampal signalling pathway has been involved in the appearance of age-related memory deficits but also in adult hippocampal neurogenesis alterations. The present study aims at testing the hypothesis that a mid-life vitamin A supplementation would be a successful strategy to prevent age-related memory deficits. Thus, middle-aged Wistar rats were submitted to a vitamin A enriched diet and were tested 4 months later in a spatial memory task. In order to better understand the potential mechanisms mediating the effects of vitamin A supplementation on hippocampal functions, we studied different aspects of hippocampal adult neurogenesis and evaluated hippocampal CRABP-I expression, known to modulate differentiation processes. Here, we show that vitamin A supplementation from middle-age enhances spatial memory and improves the dendritic arborisation of newborn immature neurons probably resulting in a better survival and neuronal differentiation in aged rats. Moreover, our results suggest that hippocampal CRABP-I expression which controls the intracellular availability of retinoic acid (RA), may be an important regulator of neuronal differentiation processes in the aged hippocampus. Thus, vitamin A supplementation from middle-age could be a good strategy to maintain hippocampal plasticity and functions.

Citation: Touyarot K, Bonhomme D, Roux P, Alfos S, Lafenêtre P, et al. (2013) A Mid-Life Vitamin A Supplementation Prevents Age-Related Spatial Memory Deficits and Hippocampal Neurogenesis Alterations through CRABP-I. PLoS ONE 8(8): e72101. doi:10.1371/journal.pone.0072101

Editor: Patrick Callaerts, VIB & Katholieke Universiteit Leuven, Belgium

Received: February 7, 2013; **Accepted:** July 4, 2013; **Published:** August 19, 2013

Copyright: © 2013 Touyarot et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by University of Bordeaux 1 and Bordeaux 2, the Conseil Regional d'Aquitaine and the French National Institute Of Food Processing (INRA). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: katia.touyarot@enscbp.fr

Introduction

The vitamin A, through its main metabolite retinoic acid (RA), plays a key role in brain development by regulating neuronal differentiation, neurite outgrowth and the anteroposterior axis of the neural tube [1,2,3]. It is now established that retinoids are required for cognitive functions in the adulthood [4,5,6,7] and that retinoid hyp signalling contributes to the deterioration of hippocampal synaptic plasticity and functions [8,9,10]. In aged rodents, the naturally occurring hypoactivity of the retinoid signalling pathway has been associated with the reduction of hippocampal synaptic plasticity [11,12], known to underlie at least in part relational memory processing [13,14]. Indeed, pharmacological activation of retinoid signalling by short-term RA treatment in aged mice restored their impaired hippocampal long-term potentiation as well as their long-term relational memory deficits [7]. Moreover, it has recently been shown that a lifelong nutritional vitamin A supplementation induced similar (even more) beneficial effects on hippocampal plasticity and memory processes [15].

One hippocampal plasticity that has mainly been studied in the recent decades is adult neurogenesis. Indeed, new neurons can be generated and survive in the adult dentate gyrus (cell proliferation,

survival mechanisms and subsequent differentiation processes) but the neurogenic rate declines precipitously from middle-age [16,17,18,19,20]. These newly born neurons have been shown to be preferentially recruited into circuits supporting various types of learning and memory [21,22,23,24,25,26], providing evidence for a critical role of adult neurogenesis in hippocampus-dependent memory including spatial memory in the Morris Water Maze [27,28,29,30]. It has been reported that decreased neurogenesis correlates with aging-associated impairments in learning and memory [31,32] but some controversial studies have shown that poorer performance was associated to a better neuronal differentiation and survival [33,34].

Vitamin A and its derivatives, as RA, act on memory processes by modulating different aspects of hippocampal plasticity including synaptic plasticity [7,12] but also adult neurogenesis in the dentate gyrus (DG) [35,36,37,38]. Indeed, it has recently been demonstrated that RA treatment can restore normal level of neurogenesis in vitamin A deficient rats [36]. Moreover, a gradient of RA, generated in the meninges, would differentially modulate adult neurogenesis between the two pyramidal blades of the rodent DG [38]. However, no studies have explored the possibility to stimulate adult hippocampal neurogenesis by acting on the retinoid signalling pathway during senescence. It is now accepted,

that in rodents and humans, aging induces an alteration of retinol metabolism that leads to a reduction of cellular RA bioavailability in target tissues [12,39,40]. In the brain, the bioavailability of RA is controlled, from circulating retinol, by local RA anabolizing and catabolizing enzymes, but also by RA binding proteins such as CRABP-I (cellular retinoic acid binding protein I) that is highly expressed in the DG [38,41]. The crucial role of CRABP-I in neurogenesis has previously been revealed during development [42]. Interestingly, a surexpression of CRABP-I has been associated with a reduction of differentiation in human neuroblastoma cells suggesting that the regulation of RA bioavailability by CRABP-I could be determinant in the modulation of neurogenesis [43]. However, its potential role in adult hippocampal neurogenesis has not been elucidated yet.

In the present study, we consequently investigated the ability of a vitamin A supplementation started at middle age, to counteract age-related spatial reference memory decline. In order to better understand the potential mechanisms mediating the effects of vitamin A supplementation on hippocampal functions, we studied different aspects of hippocampal neurogenesis (cell proliferation, cell survival and neuronal differentiation processes). Besides, we measured plasma retinol levels and hippocampal CRABP-I mRNA expression. In this study, we demonstrated for the first time that a mid-life vitamin A supplementation would be a successful strategy to prevent age-related spatial memory deficits by stimulating the differentiation of newly formed neurons and cell survival in aged rats. Moreover, our results suggest that the control of the cellular bioavailability of RA by CRABP-I could be an essential mechanism in the modulation of hippocampal adult neurogenesis by RA.

Materials and Methods

Animals

Male Wistar rats were purchased from Janvier (Le Genest Saint-Isle, France) at the age of weaning (3 weeks) and 13 months (middle-aged). They were housed two per cage in a room with a constant airflow system, controlled temperature (21–23°C), and a 12 h light/dark cycle. They were randomly divided into three experimental groups designed as young and aged groups receiving a control diet (5 month-old and 17 month-old respectively), and enriched-aged group receiving a vitamin A enriched diet (17 month-old). All animals were individually housed from 3 weeks prior to the beginning of the behavioral test until sacrifice. All experiments were performed in accordance with the European Communities Council Directives (86/609/EEC) and the French national Committee (87/848) recommendations. All animal procedures were approved by the Animal Care and Use Committee of Bordeaux.

Diet

The weaned rats (n=10) and half of the middle-aged rats (n=10) were fed with a control diet containing 5 IU retinol/g during 4 months (control condition): they are referred to as the 5-month-old young rats and the 17-month-old aged rats, respectively. The second half of the middle-aged group (n=10) received the vitamin A-enriched diet (45 IU retinol/g) for the same duration: they are referred to as the 17-month-old enriched-aged rats. The composition of the control diet was the same as the vitamin A-enriched diet, excepted for retinol content. The 45 IU diet was chosen on the basis of literature as a moderate supplementation to avoid potential toxicity of hypervitaminosis (for review, see [44]). Moreover, this vitamin A supplemented diet

was shown to counteract declarative-like memory deficits in aged mice when started at the age of 2 months [15].

Experimental Design

We have studied the effects of a mid-life vitamin A supplementation on a spatial reference memory task and hippocampal neurogenesis, known to be altered during aging (Fig. 1). Thus, the weaned rats (3-week-old) and middle-aged rats (13-month-old) received a control diet or a vitamin A enriched diet during 4 months. 3 months after the beginning of the diets, the three groups (young n=10, aged n=10, enriched-aged n=10) were injected with BrdU for 5 days. Rats were allowed to survive for another three weeks after the last injection of BrdU and continued diet in their respective experimental conditions. All groups were tested in a spatial reference memory task in the water maze and sacrificed one week after the completion of behavioral testing, to analyze hippocampal neurogenesis, serum retinol concentration and mRNA expression of CRABP-I.

5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) Injections

In order to label the newly born cells and examine hippocampal cell survival and differentiation, BrdU, a thymidine analogue incorporated into genetic material during synthetic DNA phase of mitotic division, was used. Rats received a daily intraperitoneal injection of BrdU (50 mg/kg, Sigma), dissolved in phosphate buffer (0.1 M, pH 8.4), during the 5 consecutive days beginning 3 months after the different diets.

Behavioral Testing

Rats were tested in a Morris water maze (180 cm in diameter, 60 cm high) filled with water (22°C) made opaque by addition of white paint. An escape platform was hidden 2 cm below the surface of the water in a fixed location in one of four quadrants halfway between the wall and the middle of the pool. Before the start of the training, animals were habituated to the pool without a platform for 1 min/day for 2 days. During training, animals were required to locate the submerged platform by using distal extramaze cues. They were trained for four trials per day (90 s with an intertrial interval of 60 s, starting from three different start points randomized every day) for 9 consecutive days. The swim speed, the time to reach the platform (latency) and the distance covered to find the platform were measured with a computerized tracking system (Videotrack, Viewpoint). On day 10, animals were tested for 60 s in the pool without the platform (probe test). Performance was evaluated by the percentage of time spent in the quadrant where the platform was located during training (target quadrant). Finally, in order to control for visual acuity deficits, the hidden platform was replaced by a visible platform located in the opposite quadrant, and animals were tested for three trials (90 s) over one day. Two aged rats (receiving the control diet and the enriched diet) were excluded from the experiment due to failure to search for the platform during the acquisition phase (floating) leading to a number of 9 animals in the aged group and in the enriched-aged group. For the statistical analyses, results from blocks of trials for each day were averaged for every rat.

Immunohistochemistry

Rats were euthanized with isoflurane and the brain quickly removed. Half of the dissected brains were washed with 0.9% sodium chloride, followed by 4% paraformaldehyde. After a 3-week postfixation period in paraformaldehyde, 50 µm frontal sections were cut on a vibratome (Leica). Free-floating sections were processed with a standard immunohistochemical procedure

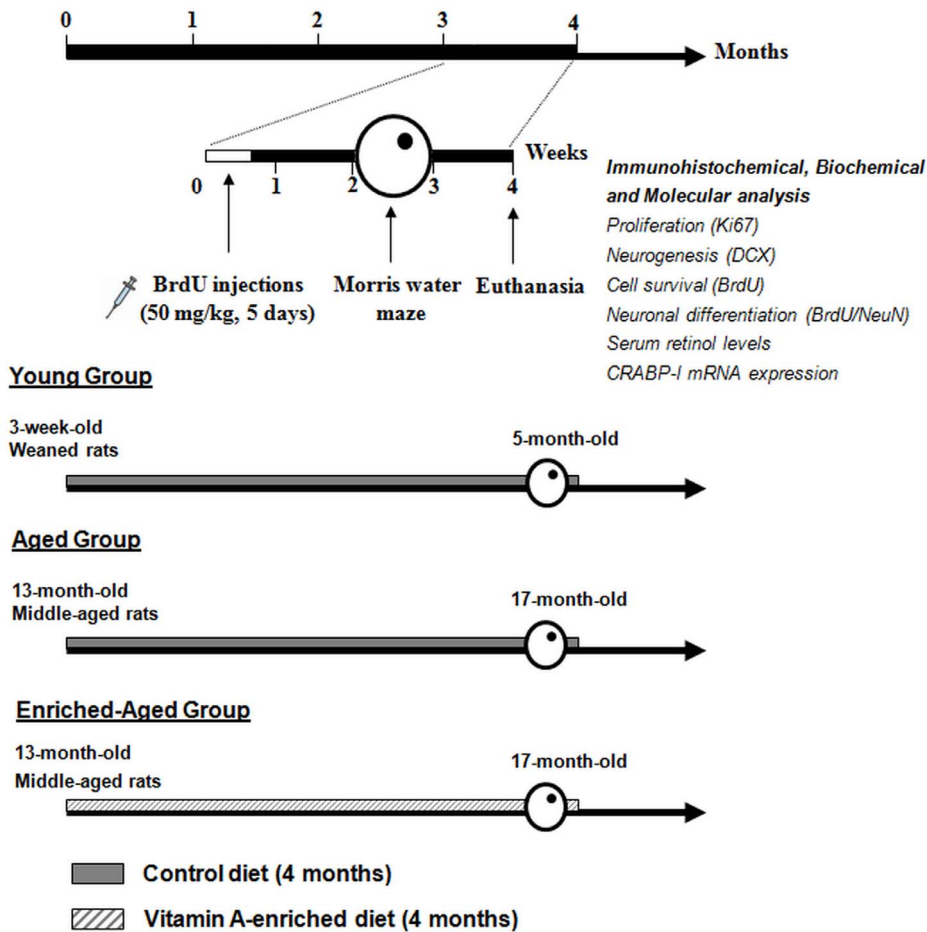


Figure 1. Experimental protocol. Effects of 4 months of vitamin A supplementation started at mid-age on spatial memory, hippocampal neurogenesis and retinoid status in rats. The weaned rats and half of the middle-aged rats were fed with a control diet containing 5 IU retinol/g during 4 months (control condition): they are referred to as the 5-month-old young rats and the 17-month-old aged rats, respectively. The second half of the middle-aged group received the vitamin A-enriched diet (45 IU retinol/g) for the same duration: they are referred to as the 17-month-old enriched-aged rats.

doi:10.1371/journal.pone.0072101.g001

[45]. A one-in-ten section was treated for Ki-67 immunoreactivity using a mouse anti-Ki-67 monoclonal antibody (1:200, Novocastra) or for doublecortin (DCX) immunoreactivity using a goat polyclonal antibody (1:1000, Santa Cruz Biotechnology). The sections were then incubated with biotinylated secondary horse anti-mouse or donkey anti-goat antibodies respectively (1:200, AbCys; 1:200, Amersham). For BrdU labeling, adjacent sections were treated with 2N HCl to denature DNA (30 min at 37°C) and then washed in phosphate buffer. Sections were incubated with a mouse monoclonal anti-BrdU antibody (1:200, Dako) followed by the biotinylated horse anti-mouse antibody (1:200, AbCys). Sections were processed in parallel, and immunoreactivities were visualized by the biotin-streptavidin technique (ABC kit, Dako) by using 3,3'-diaminobenzidine as chromogen.

The number of immunoreactive (IR) cells in the left DG was estimated by using a modified version of the optical fractionator method with a systematic random sampling of every 10 sections along the rostrocaudal axis of the DG. On each section, IR cells in the granular and subgranular layers of the DG were counted with a 100x microscope objective. All results are expressed as the total number of cells in the whole DG. The fraction of DCX-IR new neurons with large vertical dendrites (mature new neurons) corresponding to a higher level of differentiation was also counted.

To analyze the phenotype of BrdU labeled cells, 4 rats per group were randomly selected. One in-ten section was incubated with a rat anti-BrdU monoclonal antibody (1:500, Servibio), which were revealed by using goat cy3-labeled anti-rat IgG antibodies (1:1000, Interchim). Sections were then incubated with mouse monoclonal anti-NeuN antibodies (1:1000, Millipore), and bound anti-NeuN monoclonal antibodies were visualized with an Alexa 488 goat anti-rabbit IgG (1:1000, Interchim). The percentage of BrdU-labeled cells that expressed NeuN was determined throughout the DG by using a fluorescence microscope (Nikon eclipse E400) equipped with Hamamatsu digital camera and piezoelectric z-axis controller. All BrdU double labeled cells were examined, and sections were optically sliced in the Z plane by using a 1 μm interval. Cells were rotated in orthogonal planes to verify double labeling and images were analyzed by using a Nikon NIS-elements acquisition software.

Real-Time PCR Analysis of CRABP-I Expression

After the removal of the brain, the other half of the hippocampus was rapidly removed and stored at -80°C in order to measure CRABP-I expression. Extraction of RNA was conducted using an extraction kit (TRIzol reagent, Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The quality and the

concentration of RNA were determined by using a nanodrop (ND-1000) (Labtech). Then, the integrity of the purified RNA was verified using the RNA 6000 Nano LabChip kit in combination with the 2100 bioanalyser (Agilent Technologies). Using OligodT and random primers (Promega), cDNA was synthesized with ImPromII reverse transcriptase (Promega). Briefly, 1 µg of total RNA mixed with RNasin (Promega) and DNase (Roche) was incubated at 37°C. Then, OligodT and random primers were added for incubation at 70°C. The reverse transcriptase reaction was performed at 42°C for 60 min in a final volume of 20 µl.

The real-time PCR was performed using the LightCycler 480 system with a 96-well format (Roche Diagnostics) in a final volume of 20 µl, containing 1×LightCycler 480 SYBR Green I Master solution, 0.5 µM of each primer and 6 µl of cDNA. The forward and reverse primer sequences for CRABP-I and Ppib that was used as a house-keeping gene are given in Table 1. The following program started with an initial denaturation step for 10 min at 95°C, then an amplification for 40 cycles (10 s denaturation at 95°C, 6 s annealing at 62°C, and 10 s extension at 72°C), finally a melting curve analysis was run. In order to verify the specificity and the identity of the amplified products: (1) the melting curve analysis showed a single melting peak after amplification, and (2) amplified products for each gene were verified by sequencing with the Big Dye Terminator v1.1. (Applied Biosystems) and analyzed on a ABI3130 sequencer (Applied Biosystems).

The peptidylprolyl isomerase B (Ppib) housekeeping gene was used as the reference gene for relative quantification as its expression level was unaffected by our experimental conditions. Quantification data were analyzed using the LightCycler 480 Relative Quantification software (version 1.5). In order to compensate for differences in target and reference gene amplification efficiency, either within or between experiments, this software provides a calibrator-normalized relative quantification including a PCR efficiency correction. Therefore, the results are expressed as the target/reference ratio divided by the target/reference ratio of the calibrator. In our case, the calibrator was chosen among the young rats.

Measurement of Serum Retinol Concentration

Blood was collected at the sacrifice and spun at 1500 g for 15 minutes. The supernatant was removed and stored at -20°C. Serum retinol was assayed by HPLC according to a previously described method [46].

Statistical Analysis

Spatial learning and swim speed data were analyzed using a 2-way ANOVA (3 groups) followed by a post-hoc Bonferroni test. Probe test, immunohistochemical (Ki-67 and DCX only) and PCR

data were analyzed using a 1-way ANOVA followed by a post-hoc Bonferroni test. Two pairwise comparisons were performed between young and aged rats (age effect) but also between aged and enriched-aged rats (supplementation effect) using Bonferroni adjusted significance levels of 0.025. Probe test comparisons to chance level (25%) were performed in each group using one sample test. Results are expressed as mean and standard error of the mean, and they were considered significant when $p < 0.025$ for ANOVAs and Bonferroni tests or $p < 0.05$ for one sample test.

Results

Effects of a Mid-life Vitamin A Supplementation on Spatial Reference Learning and Memory in Aged Rats

The aim of this study was to determine whether a mid-life vitamin A supplementation would be efficient to prevent the age-related spatial memory deficits in rats.

Spatial learning. Results from blocks of trials for each training day were averaged for every rat. The latency to reach the hidden platform, the classical parameter used in the Morris water maze task, may reflect differences in the swimming speed of young versus aged rats. Even though we could not really put them on the fore, we rather used the distance covered to reach the platform as a more appropriate measure and as a good index of the acquisition rate for spatial learning. Indeed, the swimming speed displayed by rats over the nine training sessions has been controlled (young rats: 22.6 ± 0.36 cm/s, aged rats: 19.1 ± 0.5 cm/s, enriched-aged rats: 20.9 ± 0.38 cm/s) and the ANOVA revealed no significant difference between groups [$F(2,25) = 2.64$, $p = 0.09$] indicating that aged rats did not exhibit motor impairments.

Young and aged animals learned this task as shown by the progressive decrease in the distance covered to reach the hidden platform over the nine days of training [$F(8,200) = 19.49$, $p < 0.001$]. A significant group effect [$F(2,25) = 4.52$, $p = 0.02$] but without interaction group×days [$F(8,200) = 1.54$, n.s.] was observed in the distance covered by rats to reach the platform (Fig. 2A). Indeed, aged rats travelled significantly longer distance to find the hidden platform than young rats, putting on the fore learning impairments in aged rats (Bonferroni test between aged rats: 10.26 ± 0.4 m and young rats: 7.5 ± 0.5 m, $p < 0.01$). However, this spatial learning deficit was not reversed in aged rats receiving vitamin A enriched diet even if supplemented rats tended to travel a smaller distance to find the platform over the nine training sessions compared to aged rats receiving a control diet (Bonferroni test between aged rats: 10.26 ± 0.4 m and enriched-aged rats: 8.5 ± 0.39 m, $p = 0.08$, n.s).

Spatial reference memory. One day later, spatial memory for the platform location was tested using a probe test i.e. in the absence of the platform. ANOVA was performed on the percentage of time spent in the target quadrant in which the platform was placed at training and revealed a group effect [$F(2,25) = 8.9$, $p < 0.01$]. During the probe test, young rats spent $38.6 \pm 2.9\%$ of their time in the target quadrant suggesting that they do remember where the platform was (Fig. 2B). Indeed, one sample test analysis revealed that this percentage is significantly different from the chance level (vs 25%, $p = 0.001$). On the contrary, aged rats failed to display a memory for the platform location, as indicated by a percentage of time in the target quadrant around the chance level ($21.2 \pm 2.6\%$ vs 25%, $p = 0.2$) showing spatial reference memory deficits (Bonferroni test, between aged and young rats, $p < 0.001$). Interestingly, supplemented aged rats spent significantly more time ($33.8 \pm 3.3\%$, which is different from the chance level, $p = 0.029$) than aged rats looking

Table 1. Primers used for Light Cycler RT-PCR.

Gene name	Nucleotide sequence 5'-3'	Product length (bp)
Ppib	F : GTTCTGGAAGGCATGGATGT	153
	R : TCCCCGAGGCTCTCTACT	
CRABP-I	F : TCTTCTCCACACACCTCTCC	124
	R : TCATGCAGATGCCAAACAG	

Sequences are shown for forward (F) and reverse (R) primers. Ppib: peptidylprolyl isomerase B (cyclophilin B); CRABP I: cellular retinoic acid binding protein I.

doi:10.1371/journal.pone.0072101.t001

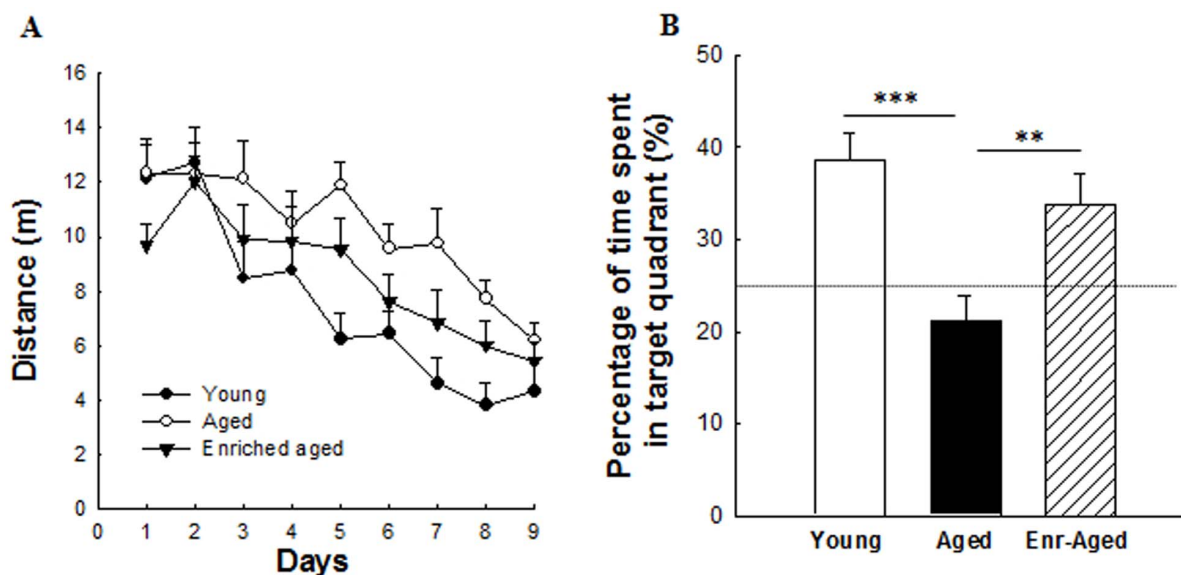


Figure 2. Effects of aging and a mid-life vitamin A supplementation on spatial learning and memory abilities in the Morris water maze. (A) Distance covered by rats to find the hidden platform along nine consecutive days (*Training*; blocks of trials for each training day are averaged) and (B) the recall of the platform location in the target quadrant (probe test) were evaluated in all groups. The dotted line corresponds to chance level (25%). Delayed rate of acquisition and reduced percentage of time in the target quadrant were observed in aged rats. Enriched-aged rats showed a clear spatial reference memory improvement. Significant *p* values after Bonferroni correction for pairwise comparisons (level $\alpha=0.025$; ***p*<0.01; ****p*<0.001).

doi:10.1371/journal.pone.0072101.g002

after the platform in the correct quadrant (Bonferroni test, between aged and enriched-aged rats, $p<0.01$).

Visible platform. After the probe trial, on day 11, rats were trained to swim towards a visible platform over three trials for a day. The distance covered to locate the visible platform was similar for all groups [$F(2,25)=1.44$, $p=0.25$] without interaction group \times trials [$F(2,50)=0.82$, $p=0.5$] indicating that the old subjects did not have any potential visual impairments (data not shown).

Effects of a Mid-life Vitamin A Supplementation on Hippocampal Neurogenesis in Aged Rats

The effects of retinoids on spatial memory have been proposed to be mediated, at least in part, by a modulation of hippocampal neurogenesis [36]. The aim of this study was thus to determine for the first time, the ability of a mid-life vitamin A supplementation to modulate the three different aspects of hippocampal neurogenesis (cell proliferation, survival of newborn cells, neuronal differentiation processes) during aging.

Cell proliferation. Cell proliferation was measured using an endogenous marker of cell cycle, Ki-67. Ki-67-labeled cells were located within the subgranular zone and were isolated or grouped in clusters (Fig. 3A). A quantitative analysis revealed a group effect [$F(2,25)=73.6$, $p<0.001$]. Aging is associated with a significant reduction (-86%) in cell proliferation (Fig. 3B, Bonferroni test, number of Ki-67-IR cells in young rats : 6368 ± 523.7 vs in aged rats : 897.7 ± 224.6 , $p<0.0001$). We tested whether the modulation of retinoid signalling in aged rats could be accompanied by a beneficial effect on cell proliferation. No effect of a mid-life vitamin A supplementation was observed on cell proliferation during aging (Bonferroni test, number of Ki-67-IR cells in aged rats 897.7 ± 224.6 vs in enriched-aged rats : 1153.3 ± 199.2 , n.s.).

Number of immature neurons. The strong reduction in cell proliferation in aged rats suggested a decrease in hippocampal neurogenesis. To test this hypothesis, we quantified the number of

immature neurons. We used doublecortin (DCX), a microtubule-associated phosphoprotein, as a marker of neurogenesis. DCX-IR cells were located in the deepest region of granule cell layer (GCL) at the interface with the hilus. In young animals, we observed many DCX-IR cells by contrast to old animals exhibiting a strong reduction in the number of DCX-IR cells (Fig. 3B). Indeed, a quantitative analysis revealed a group effect [$F(2,25)=191.7$, $p<0.001$] and Bonferroni test ($p<0.0001$) confirmed that aging is associated with a strong reduction (-90%) in the number of immature neurons in the rat hippocampus [Fig. 3B, number of immature neurons in young rats : 22090 ± 1205 vs in aged rats : 2368.8 ± 279.3]. However, vitamin A supplementation had no effect on the number of newly generated immature neurons in aged rats (Bonferroni test, n.s, number of immature neurons in enriched-aged rats : 3175.5 ± 530.4).

Dendritic arborisation of immature neurons, cell survival and neuronal differentiation. Immunohistochemical images revealed that DCX-positive immature neurons in aged rats were not only fewer in number but also characterized by a decrease in dendritic arborisation, potentially reflecting retarded maturation (Fig. 4A). Therefore, we investigated the degree of maturation of the newly born neurons by differentiating more mature DCX-IR cells with vertical dendrites emanating from the soma and extending into the dentate molecular layer through the GCL (presumably more mature new neurons) from DCX-IR cells with horizontally orientated soma and dendrites in the SGZ or without dendritic projections [47]. We studied the ability of vitamin A supplementation to promote dendritic growth and neuronal maturation during aging. Quantitative analysis revealed that aged rats receiving a vitamin A enriched diet had significantly higher proportion of immature DCX-IR neurons with vertical dendrites, reflecting better maturation, compared to control aged rats [$F(1,16)=10.5$, $+12\%$ between aged rats : $53.2 \pm 1.9\%$ and enriched aged rats : $65.1 \pm 2.8\%$, $p<0.01$].

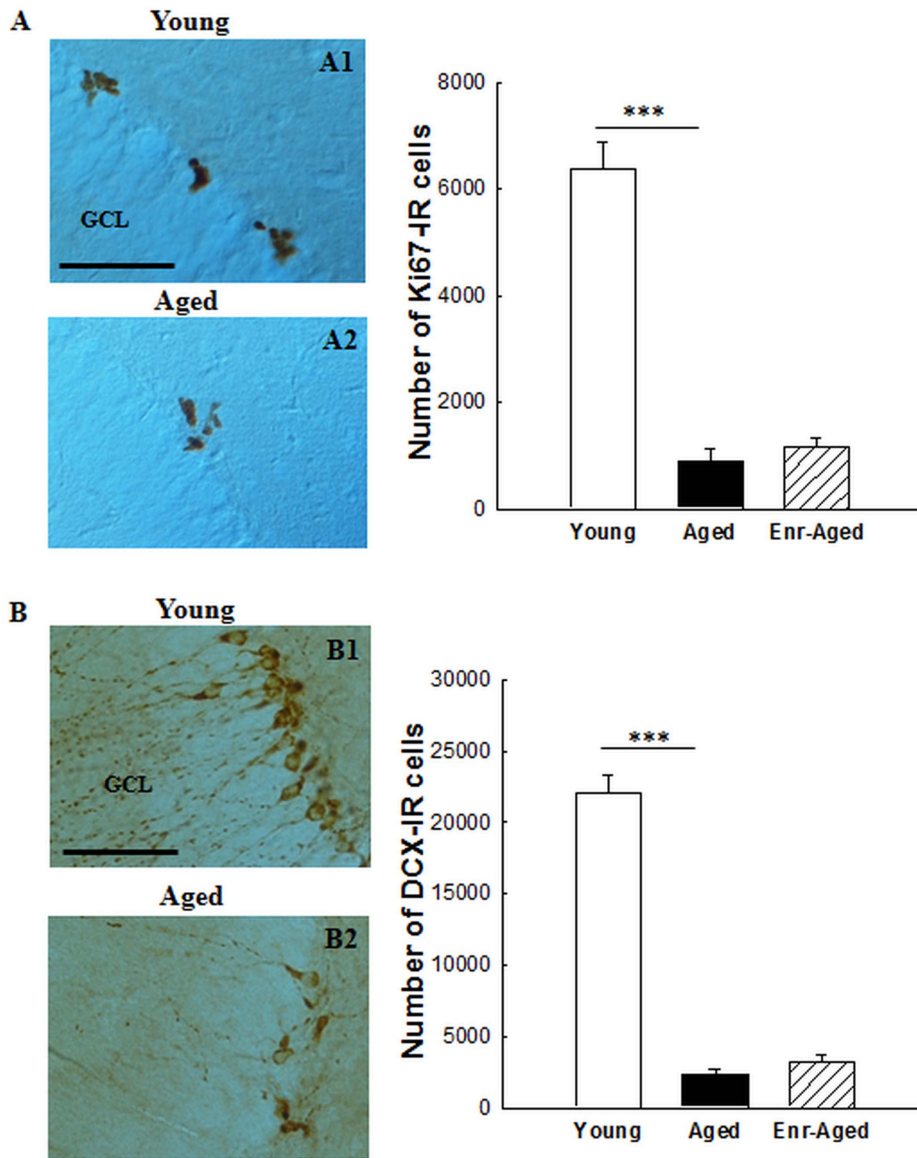


Figure 3. Effects of aging and a mid-life vitamin A supplementation on the number of Ki67-IR and DCX-IR cells. Images show the immunoperoxidase staining of (A) Ki67-IR and (B) DCX-IR cells in the DG granule cell layer of young and aged rats. The graphs indicate the strong reduction of the number of Ki67-IR and DCX-IR cells in aged rats. Vitamin A supplementation does not affect cell proliferation nor the number of immature neurons in aged rats. Significant p values after Bonferroni correction for pairwise comparisons (level $\alpha=0.025$; $***p<0.001$). Scale bar : 50 μm . GCL=granule cell layer. doi:10.1371/journal.pone.0072101.g003

To investigate whether the higher degree of maturation of new born cells in enriched rats could be associated with a more pronounced survival of these cells, we analyzed cell survival using a 3-week interval between injection of BrdU and sacrifice of the animals. We found that most of the 3-week-old surviving BrdU-IR cells were isolated, round, large and located within the GCL (Fig. 4B). As shown in Fig. 4B, a vitamin A enriched diet from mid-life stimulated the survival BrdU-IR cells as they were more numerous in enriched-aged rats (+26%) than in their aged control group [$F(1,16)=8.5$, number of BrdU-IR cells in aged rats : 793.3 ± 65.7 vs in enriched aged rats : 1078 ± 65.8 , $p<0.01$].

The phenotype of newly born cells labeled with BrdU was determined using NeuN, a mature neuronal marker. The percentage of BrdU/NeuN double stained cells located in the GCL (Fig. 4C) was increased in enriched-aged rats [$F(1,6)=51.88$,

$p<0.001$, between aged rats: $14.4\pm 1.7\%$ and enriched-aged rats : $35.2\pm 2.25\%$]. Thus, a more developed dendritic arborisation of immature neurons in enriched aged rats would result in a selective and better survival and neuronal differentiation of this particular population of newly born cells.

Effects of a Mid-life vitamin A Supplementation on Retinoid Status in Aged Rats

Assay of serum retinol. The analysis of serum retinol levels was performed after the behavioral studies in order to confirm the retinoid status of aged rats (Fig. 5A). Quantitative analysis revealed differences between groups [$F(2,25)=28.72$; $p<0.001$]. A significant reduction (- 41%) in serum retinol concentration was observed in aged rats relative to young rats (Bonferroni test, $p<0.001$, between young and aged rats; $1.033\pm 0.06 \mu\text{mol/l}$

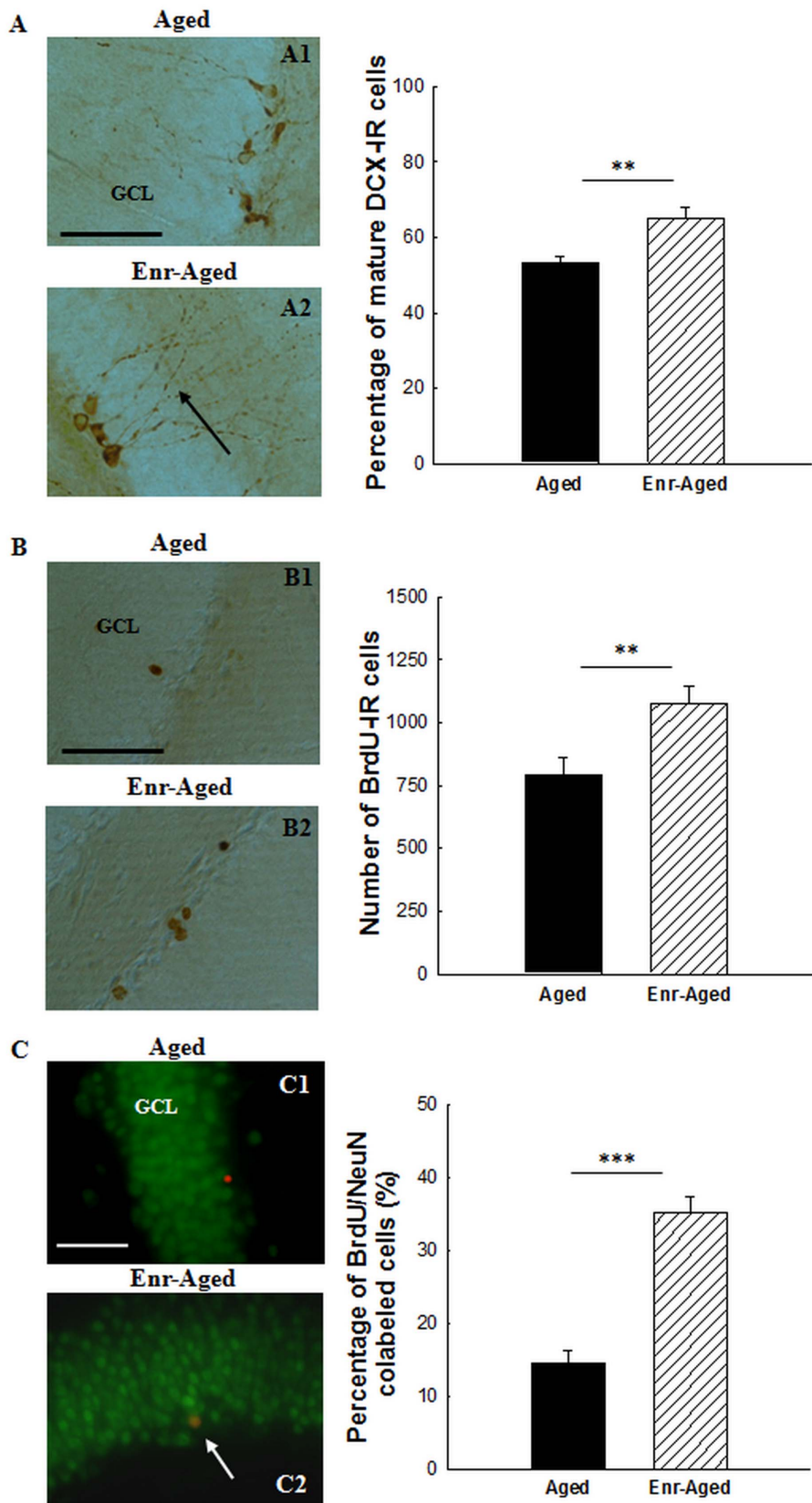


Figure 4. Effects of a mid-life vitamin A supplementation on maturation of DCX-IR cells, survival of BrdU-IR cells and neuronal differentiation in aged rats. Images show immunostaining of (A) DCX-IR cells (B) BrdU-IR cells (C) BrdU/NeuN colabeled cells in the DG granule cell layer of aged and enriched-aged rats. Enriched-aged rats showed (A) an increased number of mature DCX-IR cells, (B) an increased number of BrdU-IR cells and (C) a higher percentage of BrdU/NeuN colabeled cells. Significant p values after ANOVA (**p<0.01, ***p<0.001). The black arrow in A2 points

to DCX-IR cells with vertical dendritic ramifications and the white arrow in C2 to a BrdU/NeuN colabeled cell in enriched aged rats. Scale bar : 50 μm . GCL = granule cell layer.
doi:10.1371/journal.pone.0072101.g004

versus $0.6 \pm 0.04 \mu\text{mol/l}$). However, a vitamin A supplementation diet did not increase serum retinol concentration in aged rats (Bonferroni test, n.s. between aged and enriched-aged rats; $0.6 \pm 0.04 \mu\text{mol/l}$ versus $0.465 \pm 0.05 \mu\text{mol/l}$).

We examined the existence of linear correlations between the degree of maturation of newly born neurons and serum retinol levels for individual rats. A positive correlation was observed between the percentage of DCX-IR cells with vertical dendrites and serum retinol levels in young and aged rats (Fig. 5B; $r = 0.64$, $p < 0.002$, $n = 19$): rats with high level of serum retinol exhibited a higher percentage of DCX-IR cells with a more mature

phenotype. Moreover, we have also observed a positive correlation between serum retinol levels and spatial memory in young and aged rats (Fig. 5C probe test and serum retinol level, $r = 0.67$, $p = 0.001$). No correlation has been observed if we integrate the enriched-aged group to the regression analysis (data not shown).

mRNA expression of CRABP-I in the hippocampus. The ability of vitamin A supplementation to promote the maturation of newly generated neurons and improve memory abilities in aged rats could be in part mediated by the intracellular availability of RA which is determined by many regulatory proteins such as retinoic acid binding proteins I (CRABP-I), known to play an

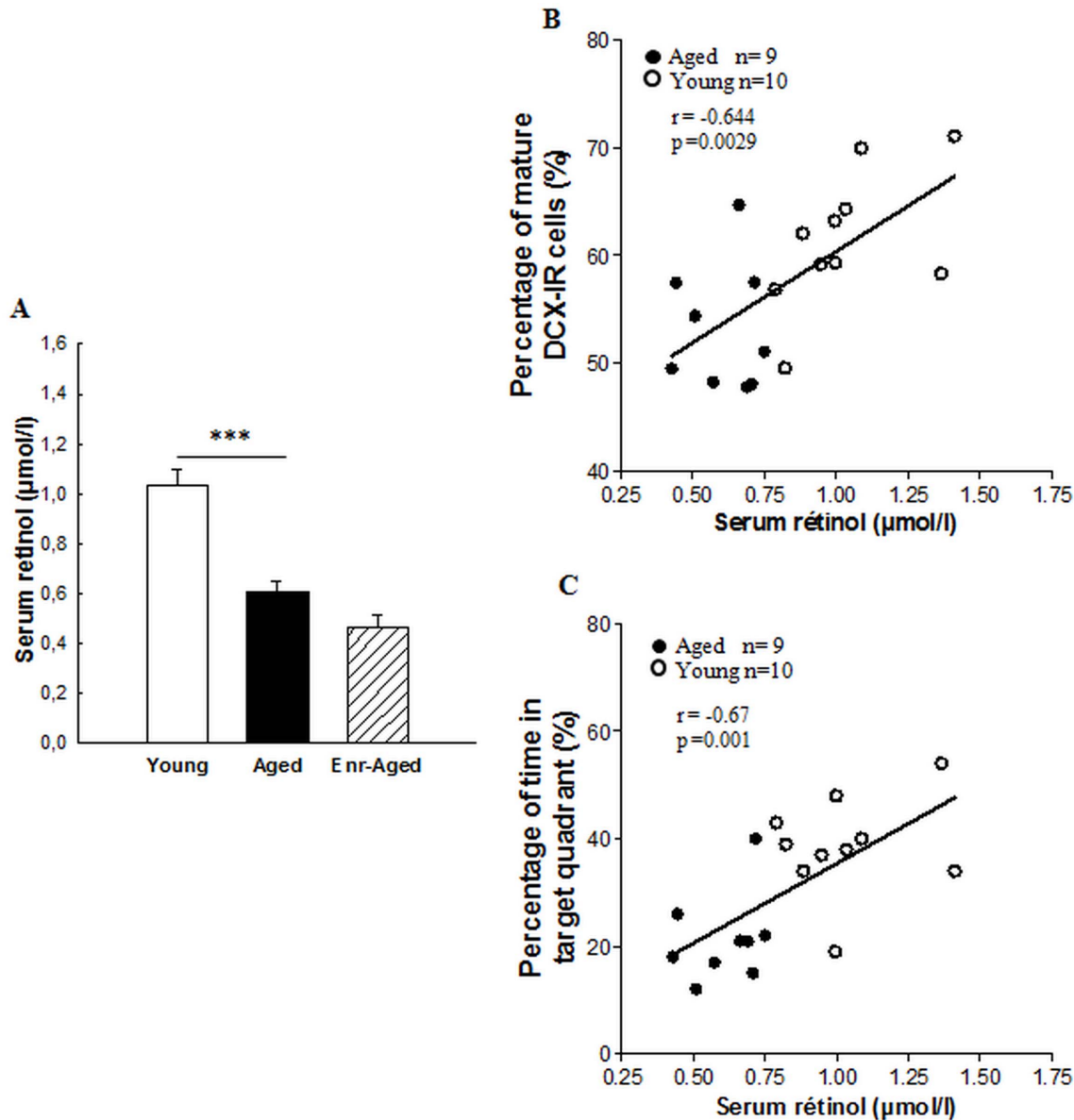


Figure 5. Effects of aging and a mid-life vitamin A supplementation on serum retinol levels. (A) Aging decreases serum retinol levels. Significant p values after Bonferroni correction for pairwise comparisons (level $\alpha = 0.025$; $***p < 0.001$). (B)(C) Correlation analyses. (B) Percentage of mature DCX-IR cells and (C) spatial memory correlate with serum retinol levels in young and aged rats ($r = 0.644$, $p < 0.01$ and $r = 0.67$, $p < 0.001$ respectively).

doi:10.1371/journal.pone.0072101.g005

important role in RA-mediated differentiation processes [42]. As seen in Fig. 6A, quantitative analysis of hippocampal CRABP-I mRNA expression indicated differences between groups [$F(2,25) = 4.95$; $p < 0.025$]. Indeed, we observed that aging up-regulates CRABP-I mRNA expression (+70%, Bonferroni test, $p < 0.01$, between young rats : 1 ± 0.09 a.u. and aged rats : 1.7 ± 0.25 a.u.). By contrast, vitamin A supplementation reduced hippocampal CRABP-I mRNA expression in aged rats (Bonferroni test, $p < 0.025$, between aged rats : 1.7 ± 0.25 a.u. and enriched-aged rats : 1.1 ± 0.13 a.u.).

We examined the existence of linear correlations between the degree of maturation of newly born neurons and hippocampal CRABP-I mRNA expression for the three groups of rats. A negative correlation was observed between CRABP-I mRNA expression levels and the percentage of DCX-IR cells with vertical dendrites ($r = 0.432$, $p = 0.02$, $n = 28$, Fig. 6B) : rats with lower level of hippocampal CRABP-I mRNA expression exhibited a high percentage of DCX-IR cells with vertical dendrites, reflecting a more mature phenotype. This correlation was also observed if we only integrated young and aged groups to the regression analysis ($r = 0.476$, $p = 0.03$, $n = 19$, data not shown).

Discussion

In the present study, we demonstrate for the first time that 4 months of nutritional vitamin A supplementation started at mid-life improve the spatial memory and the level of differentiation of newborn neurons in aged Wistar rats. Moreover, our results suggest that hippocampal CRABP-I expression which controls the intracellular availability of RA, may be an important regulator of neuronal differentiation processes in the aged hippocampus.

In agreement with a previous study showing that a life-long vitamin A supplementation can prevent age-related short term working memory deterioration [15], our data confirm the idea that acting on the retinoid signalling pathway by a nutritional approach could be of great interest to alleviate age-induced memory deficits. Some memory deficits during aging can be partly explained by

alterations of cerebral plasticity including adult hippocampal neurogenesis [48]. Moreover, age-related memory loss begins to appear at middle-age and coincides with reduced adult hippocampal neurogenesis [19,49]. Thus, our study confirms the beneficial effects of vitamin A on age-induced spatial memory deficits but also demonstrates for the first time that supplementation started at mid-life is efficient to improve hippocampal neurogenesis and functions in aged rats.

Consistent with the age-related decline in hippocampal neurogenesis [19,33,50,51], our study shows a strong decrease in cell proliferation and in the number of immature neurons in aging rats. Interestingly, we report that the spatial memory impairments in aged rats were accompanied by an abnormal differentiation of immature neurons. Here, we demonstrate that aged rats had significant lower mature DCX positive cells with vertical dendritic ramifications that are usually observed in young rats. This finding is in line with a recent study showing that age-related spatial memory impairments are associated with alterations in the differentiation of immature neurons [32]. Indeed, Nyffeler et al. have shown a higher proportion of Nestin-DCX double labelled cells in learning-impaired aged rats, suggesting a less mature stage of this pool of neuronal progenitors. This hypothesis is also in line with data showing a significant retardation of dendritic growth during the DCX expression phase of newborn neurons in aged rats [18].

Our experiments also suggest that promotion of maturation of newborn neurons in supplemented aged rats could be one plausible mechanism by which vitamin A supplementation might exert promnesic effects. Indeed, we have shown that vitamin A supplementation started at mid-life does not improve cell proliferation or the number of immature neurons in aged rats, but this preventive nutritional strategy is very potent to increase dendritic arborisation of DCX-positive cells, probably resulting in a better survival and neuronal differentiation. This is partly confirmed by the higher percentage of BrdU/NeuN cells observed in enriched-aged rats compared to aged rats. Thus, the integration

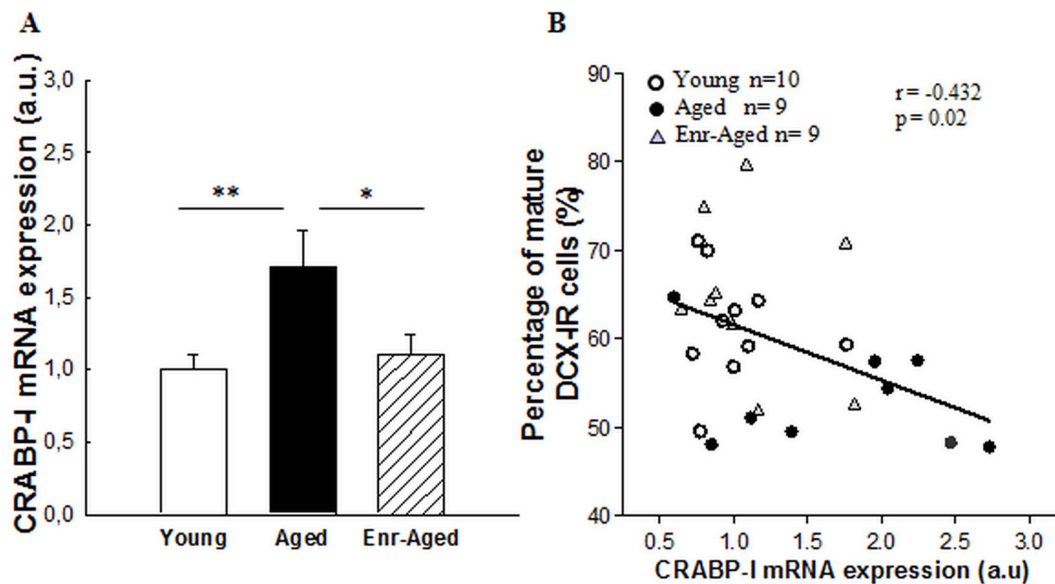


Figure 6. Effects of aging and a mid-life vitamin A supplementation on mRNA expression of CRABP-I in the hippocampus. (A) CRABP-I mRNA expression as quantified by Real Time-PCR. Vitamin A supplementation normalized aging-induced up-regulation of CRABP-I mRNA expression. Significant p values after Bonferroni correction for pairwise comparisons (level $\alpha = 0.025$; * $p < 0.025$). (B) Correlation analyses. Percentage of mature DCX-IR cells correlates with hippocampal CRABP-I mRNA expression in all groups ($r = 0.43$, $p < 0.05$). doi:10.1371/journal.pone.0072101.g006

of these newborn neurons into the hippocampal circuitry could facilitate spatial memory performances in the enriched-aged rats. Consistent with the present results, it has been shown that aged rats with preserved spatial memory exhibited a better survival and differentiation examined 3 weeks after learning (under basal conditions) compared to aged rats displaying spatial memory impairments [31]. Moreover, the ability to perform hippocampus-related functions could also result from changing the dynamics of hippocampal neurogenesis in the course of learning. Indeed, spatial learning has been reported to promote the survival of newborn cells generated before learning [52,53,54], to accelerate the differentiation of selected newborn cells toward a neuronal phenotype and to increase the dendritic development [55]. Thus, although our results might suggest that vitamin A supplementation could directly increase maturation of new neurons in aged rats showing better spatial memory performances, we cannot exclude the potential influence of spatial learning on hippocampal neurogenesis in the different groups.

Similarly, several studies using vitamin A deficiency (VAD) models, have shown that this vitamin is necessary for neuronal differentiation and survival [35] but also for cell proliferation in the DG of the hippocampus [36]. Indeed, it has been demonstrated that the effect of vitamin A deficient diet on the level of hippocampal neurogenesis is reversible and that RA treatment can restore hippocampal neurogenesis and correct spatial memory deficits in vitamin A deficient rats [36]. Nutrition is an important extrinsic factor which modulates adult hippocampal neurogenesis [56], but other factors such as environmental enrichment or physical activity starting from middle-age, have also been shown to be efficient in the prevention of hippocampal neurogenesis and memory alterations [17,47]. Indeed, comparable increases in BrdU-positive cells double-labeled for the neuronal marker NeuN have been described for aged mice stimulated with an enriched environment and showing preserved spatial learning performances [51].

Such effects on hippocampal neurogenesis may probably act in concert with stimulation of synaptic plasticity. Indeed, the suppression of neurogenesis by irradiation or genetic ablation has been shown to disrupt LTP in the dentate gyrus [57] and impairs some forms of hippocampus-dependent learning and memory [58,59]. Conversely, conditions that stimulate adult neurogenesis in mice also increase LTP [60,61]. Similarly, the activation of the RA signalling pathway can improve hippocampal plasticity either by enhancing synaptic strength as measured by LTP or by synaptic remodelling, known to modulate hippocampal-dependent memory processes [7,8,15,62].

In order to better understand some potential mechanisms involved in the regulation of hippocampal neurogenesis and spatial learning by vitamin A supplementation, we have evaluated serum retinol concentrations and hippocampal CRABP-I expression, indicators of vitamin A status and intracellular availability of RA. Vitamin A is mobilized from liver stores and transported into the plasma bound to a carrier protein [63]. At the target cell level, retinol is oxidised to RA which binds to cellular retinoic acid-binding proteins (CRABPs). This binding is known to regulate the nuclear activity of RA [63,64]. In the present study, aged rats exhibited a significant decrease in the serum retinol concentration compared to young rats, but vitamin A enriched diet failed to normalize this level. This reduction has been earlier reported in aged rats and humans [39,40,65] and could be explained during senescence by a loss of the capacity to mobilize vitamin A from the liver and thereby to regulate serum retinol levels, without affecting its ability of storage [66,67]. Thus, these age-induced alterations of retinol metabolism would explain why the newly absorbed vitamin

A from the diet was unable to correct serum retinol levels in aged rats. It has been shown that reduction in vitamin A metabolism during aging resulted in RA deficit at the cellular level [40]. However, in vitamin A deficiency, target tissues can directly use newly absorbed vitamin A from diet, in order to rapidly synthesize RA [41]. Thus, in enriched-aged rats which failed to normalize the serum retinol level, this newly absorbed vitamin A would be immediately used by target tissues such as the brain, to increase local synthesis of RA. In the rodent hippocampus, RA is synthesized from the meninges by anabolic enzymes (RALDHs) and would diffuse from this source to the blades of the DG [38]. It is probably one of the mechanisms by which vitamin A enriched diet would increase the levels of intracellular RA in the aged hippocampus without mobilization of vitamin A from the liver.

Moreover, the CRABPs (CRABP I and CRABP II) are also important regulators of the cellular bioavailability of RA in the brain [68,69]. Only CRABP-I is expressed in the hippocampus and more particularly in the dentate gyrus [38]. The precise role of CRABPs in RA signalling is still unclear, but some data provide evidence that CRABP-I buffers the free intracellular RA, and regulates by this way, the amount accessible to its nuclear receptors and therefore, its activity [70,71]. Here, we show that aging induced an up-regulation of hippocampal CRABP-I mRNA expression, normalized by vitamin A supplementation. This result suggests that vitamin A enriched-diet could normalize the level of free cellular RA in aged rats by a negative regulation of CRABP-I expression. This hypothesis is also sustained by a negative correlation evidenced between serum retinol levels and CRABP-I expression in young and aged groups (data not shown).

Together, the decreased hippocampal CRABP-I expression and the increased amount of intracellular RA synthesized from newly absorbed vitamin A in enriched aged group would lead to an over saturation of the binding capacities of CRABP-I. Therefore, the remaining free RA could bind to their nuclear receptors and modulate transcription of genes involved in hippocampal plasticity such as neurogenesis.

In the present study, we observed that inadequate vitamin A metabolism in aged rats could have some consequences on hippocampal neurogenesis and functions. Indeed, we evidenced a positive correlation between level of serum retinol, maturation of DCX positive cells and also spatial memory in young and aged groups. This result is coherent with other studies showing that demented patients exhibited low serum retinol concentration [72,73]. In enriched aged rats, the newly absorbed vitamin A from diet would be used to increase local synthesis of RA which would stimulate hippocampal neurogenesis and spatial memory. This hypothesis is supported by the detection of a gradient of RA which diffuses from the meninges across the infrapyramidal and suprapyramidal blades of the DG to differentially regulate hippocampal neurogenesis between these two blades [38].

Moreover, it has been shown that CRABP-I could play a crucial role in differentiation processes *in vitro* : (i) the up-regulation of CRABP-I in human neuroblastoma cells reduced their differentiation potential [43], (ii) the overexpression of CRABP I in F9 cells decreased their RA-induced differentiation and high concentration of RA become required for this cells to recover the responsiveness to RA, (iii) a reduced level of CRABP I led to a higher RA sensitivity of the cells to differentiate [74,75]. Accordingly to these studies, we have shown negative correlations between hippocampal CRABP-I expression and maturation of DCX positive cells suggesting that age-related up-regulation of hippocampal CRABP-I could contribute to hippocampal neurogenesis alterations. Moreover, this correlation is maintained if we integrate the enriched-aged group to the regression analysis. On

the contrary, no significant correlations were found between serum retinol and hippocampal neurogenesis in all groups (young, aged and enriched-aged). Thus, even if during senescence there is a loss of the capacity to regulate serum retinol levels by the diet, the newly absorbed vitamin A would be immediately used by target tissues such as the hippocampus leading to the normalization of the level of CRABP-I gene expression which could be determinant for hippocampal differentiation processes and thereby for hippocampal functions.

Thus, the expression of CRABP-I gene must be tightly controlled in order to maintain a homeostatic supply of free intracellular RA but this bioavailability can also be evaluated by measuring the expression of retinoid receptors. Several studies have demonstrated age-related decreases in mRNA expression or protein levels of retinoid receptors in mice and rat brain [7,11,12,15,50] indicating a decreased bioavailability of the ligand, which can be normalized by RA treatment or vitamin A supplementation. Interestingly, it has recently been demonstrated that the dysfunctioning of retinoid signalling induced by VAD decreased immunoreactivity of some retinoid receptors (RAR α and β) in the hippocampus, whereas immunoreactivity of RXR α and β was increased in the same area [76,77]. Similarly, an hippocampal over-expression of RXR α has been found in the aged rats of the present study and this effect can be restored by vitamin A supplementation (data not shown). Thus, although the newly absorbed vitamin A from the diet was unable to correct serum retinol levels in aged rats, as previously discussed, vitamin A supplementation can modulate hippocampal expression of some

retinoid receptors in aged rats suggesting that our findings on CRABP-I gene expression, neurogenesis and cognitive functions could be mediated, at least in part, through these retinoid receptors.

Altogether, the present study demonstrates for the first time that vitamin A supplementation from middle-age improves the level of differentiation of newly born neurons and enhances spatial memory during senescence. The normalization of the hippocampal expression of CRABP-I and thereby the increased bioavailability of intracellular RA could be a possible mechanism by which vitamin A supplementation acts on neuronal differentiation processes and exerts its promnesic effects during aging. As the dysfunctioning of retinoid signalling has been suggested to be involved in the aetiology of some neurodegenerative diseases such as Alzheimer's Disease (AD) [78,79,80,81], vitamin A supplementation from middle-age could be widely proposed for alleviating cognitive decline but also for delaying neurodegenerative processes.

Acknowledgments

The authors are grateful to Rachel Hamiani for animal care and Jean-Christophe Delpech for his technical help in immunofluorescence analysis.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: KT PH. Performed the experiments: KT DB PR ER. Analyzed the data: KT. Contributed reagents/materials/analysis tools: ER. Wrote the paper: KT SA PL VP.

References

- McCaffery P, Drager UC (2000) Regulation of retinoic acid signaling in the embryonic nervous system: a master differentiation factor. *Cytokine Growth Factor Rev* 11: 233–249.
- Maden M (2002) Retinoid signalling in the development of the central nervous system. *Nat Rev Neurosci* 3: 843–853.
- McCaffery PJ, Adams J, Maden M, Rosa-Molinar E (2003) Too much of a good thing: retinoic acid as an endogenous regulator of neural differentiation and exogenous teratogen. *Eur J Neurosci* 18: 457–472.
- Lane MA, Bailey SJ (2005) Role of retinoid signalling in the adult brain. *Prog Neurobiol* 75: 275–293.
- McCaffery P, Zhang J, Crandall JE (2006) Retinoic acid signaling and function in the adult hippocampus. *J Neurobiol* 66: 780–791.
- Olson CR, Mello CV (2010) Significance of vitamin A to brain function, behavior and learning. *Mol Nutr Food Res* 54: 489–495.
- Etchamendy N, Enderlin V, Marighetto A, Vouimba RM, Pallet V, et al. (2001) Alleviation of a selective age-related relational memory deficit in mice by pharmacologically induced normalization of brain retinoid signaling. *J Neurosci* 21: 6423–6429.
- Misner DL, Jacobs S, Shimizu Y, de Urquiza AM, Solomin L, et al. (2001) Vitamin A deprivation results in reversible loss of hippocampal long-term synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 11714–11719.
- Cocco S, Diaz G, Stancampiano R, Diana A, Carta M, et al. (2002) Vitamin A deficiency produces spatial learning and memory impairment in rats. *Neuroscience* 115: 475–482.
- Etchamendy N, Enderlin V, Marighetto A, Pallet V, Higuere P, et al. (2003) Vitamin A deficiency and relational memory deficit in adult mice: relationships with changes in brain retinoid signalling. *Behav Brain Res* 145: 37–49.
- Enderlin V, Pallet V, Alfios S, Dargelos E, Jaffard R, et al. (1997) Age-related decreases in mRNA for brain nuclear receptors and target genes are reversed by retinoic acid treatment. *Neurosci Lett* 229: 125–129.
- Feart C, Mingaud F, Enderlin V, Husson M, Alfios S, et al. (2005) Differential effect of retinoic acid and triiodothyronine on the age-related hypo-expression of neurogranin in rat. *Neurobiol Aging* 26: 729–738.
- Eichenbaum H, Dudchenko P, Wood E, Shapiro M, Tanila H (1999) The hippocampus, memory, and place cells: is it spatial memory or a memory space? *Neuron* 23: 209–226.
- Eichenbaum H (2004) Hippocampus: cognitive processes and neural representations that underlie declarative memory. *Neuron* 44: 109–120.
- Mingaud F, Mormede C, Etchamendy N, Mons N, Niedergang B, et al. (2008) Retinoid hyposignaling contributes to aging-related decline in hippocampal function in short-term/working memory organization and long-term declarative memory encoding in mice. *J Neurosci* 28: 279–291.
- Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH (1996) Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci* 16: 2027–2033.
- Kempermann G, Gast D, Gage FH (2002) Neuroplasticity in old age: sustained fivefold induction of hippocampal neurogenesis by long-term environmental enrichment. *Ann Neurol* 52: 135–143.
- Rao MS, Hattiangady B, Abdel-Rahman A, Stanley DP, Shetty AK (2005) Newly born cells in the ageing dentate gyrus display normal migration, survival and neuronal fate choice but endure retarded early maturation. *Eur J Neurosci* 21: 464–476.
- Driscoll I, Howard SR, Stone JC, Monfils MH, Tomanek B, et al. (2006) The aging hippocampus: a multi-level analysis in the rat. *Neuroscience* 139: 1173–1185.
- Drapeau E, Nora Abrous D (2008) Stem cell review series: role of neurogenesis in age-related memory disorders. *Aging Cell* 7: 569–589.
- Gross CG (2000) Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma. *Nat Rev Neurosci* 1: 67–73.
- Cameron HA, Woolley CS, McEwen BS, Gould E (1993) Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience* 56: 337–344.
- Piatti VC, Esposito MS, Schinder AF (2006) The timing of neuronal development in adult hippocampal neurogenesis. *Neuroscientist* 12: 463–468.
- Abrous DN, Koehl M, Le Moal M (2005) Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. *Physiol Rev* 85: 523–569.
- Leuner B, Gould E, Shors TJ (2006) Is there a link between adult neurogenesis and learning? *Hippocampus* 16: 216–224.
- Deng W, Aimone JB, Gage FH (2010) New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat Rev Neurosci* 11: 339–350.
- Dupret D, Revest JM, Koehl M, Ichas F, De Giorgi F, et al. (2008) Spatial relational memory requires hippocampal adult neurogenesis. *PLoS One* 3: e1959.
- Snyder JS, Hong NS, McDonald RJ, Wojtowicz JM (2005) A role for adult neurogenesis in spatial long-term memory. *Neuroscience* 130: 843–852.
- Zhang CL, Zou Y, He W, Gage FH, Evans RM (2008) A role for adult TLX-positive neural stem cells in learning and behaviour. *Nature* 451: 1004–1007.
- Garthe A, Behr J, Kempermann G (2009) Adult-generated hippocampal neurons allow the flexible use of spatially precise learning strategies. *PLoS One* 4: e5464.
- Drapeau E, Mayo W, Aurousseau C, Le Moal M, Piazza PV, et al. (2003) Spatial memory performances of aged rats in the water maze predict levels of hippocampal neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 14385–14390.

32. Nyffeler M, Yee BK, Feldon J, Knuesel I (2010) Abnormal differentiation of newborn granule cells in age-related working memory impairments. *Neurobiol Aging* 31: 1956–1974.
33. Bizon JL, Gallagher M (2003) Production of new cells in the rat dentate gyrus over the lifespan: relation to cognitive decline. *Eur J Neurosci* 18: 215–219.
34. Bizon JL, Lee HJ, Gallagher M (2004) Neurogenesis in a rat model of age-related cognitive decline. *Aging Cell* 3: 227–234.
35. Jacobs S, Lie DC, DeCicco KL, Shi Y, DeLuca LM, et al. (2006) Retinoic acid is required early during adult neurogenesis in the dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 3902–3907.
36. Bonnet E, Touyarot K, Alfoss S, Pallet V, Higuere P, et al. (2008) Retinoic acid restores adult hippocampal neurogenesis and reverses spatial memory deficit in vitamin A deprived rats. *PLoS One* 3: e3487.
37. Crandall J, Sakai Y, Zhang J, Koul O, Mineur Y, et al. (2004) 13-cis-retinoic acid suppresses hippocampal cell division and hippocampal-dependent learning in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 5111–5116.
38. Goodman T, Crandall JE, Nanesco SE, Quadro L, Shearer K, et al. (2012) Patterning of retinoic acid signaling and cell proliferation in the hippocampus. *Hippocampus*.
39. van der Loo B, Labugger R, Aebischer CP, Bachschmid M, Spitzer V, et al. (2004) Age-related changes of vitamin A status. *J Cardiovasc Pharmacol* 43: 26–30.
40. Feart C, Pallet V, Boucheron C, Higuere D, Alfoss S, et al. (2005) Aging affects the retinoic acid and the triiodothyronine nuclear receptor mRNA expression in human peripheral blood mononuclear cells. *Eur J Endocrinol* 152: 449–458.
41. Ross AC, Russell RM, Miller SA, Munro IC, Rodricks JV, et al. (2009) Application of a key events dose-response analysis to nutrients: a case study with vitamin A (retinol). *Crit Rev Food Sci Nutr* 49: 708–717.
42. Wilson IJ, Myat A, Sharma A, Maden M, Wingate RJ (2007) Retinoic acid is a potential dorsalisating signal in the late embryonic chick hindbrain. *BMC Dev Biol* 7: 138.
43. Uhrig M, Brechlin P, Jahn O, Knyazev Y, Weninger A, et al. (2008) Upregulation of CRABP1 in human neuroblastoma cells overproducing the Alzheimer-typical A β 42 reduces their differentiation potential. *BMC Med* 6: 38.
44. Penniston KL, Tanumihardjo SA (2006) The acute and chronic toxic effects of vitamin A. *Am J Clin Nutr* 83: 191–201.
45. Lemaire V, Lamarque S, Le Moal M, Piazza PV, Abrous DN (2006) Postnatal stimulation of the pups counteracts prenatal stress-induced deficits in hippocampal neurogenesis. *Biol Psychiatry* 59: 786–792.
46. Biesalski HK, Ehrenthal W, Gross M, Hafner G, Harth O (1983) Rapid determination of retinol (vitamin A) in serum by high pressure liquid chromatography (HPLC). *Int J Vitam Nutr Res* 53: 130–137.
47. Marlatt MW, Potter MC, Lucassen PJ, van Praag H (2012) Running throughout middle-age improves memory function, hippocampal neurogenesis, and BDNF levels in female C57BL/6J mice. *Dev Neurobiol* 72: 943–952.
48. Koehl M, Abrous DN (2011) A new chapter in the field of memory: adult hippocampal neurogenesis. *Eur J Neurosci* 33: 1101–1114.
49. Erickson CA, Barnes CA (2003) The neurobiology of memory changes in normal aging. *Exp Gerontol* 38: 61–69.
50. Dyllan SC, Michael GJ, Michael-Titus AT (2010) Omega-3 fatty acids reverse age-related decreases in nuclear receptors and increase neurogenesis in old rats. *J Neurosci Res* 88: 2091–2102.
51. Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH (1998) Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. *J Neurosci* 18: 3206–3212.
52. Drapeau E, Montaron MF, Aguerre S, Abrous DN (2007) Learning-induced survival of new neurons depends on the cognitive status of aged rats. *J Neurosci* 27: 6037–6044.
53. Gould E, Beylin A, Tanapat P, Reeves A, Shors TJ (1999) Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nat Neurosci* 2: 260–265.
54. Dupret D, Fabre A, Dobrossy MD, Panatier A, Rodriguez JJ, et al. (2007) Spatial learning depends on both the addition and removal of new hippocampal neurons. *PLoS Biol* 5: e214.
55. Tronel S, Fabre A, Charrier V, Olier SH, Gage FH, et al. (2010) Spatial learning sculpts the dendritic arbor of adult-born hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 7963–7968.
56. Zainuddin MS, Thuret S (2012) Nutrition, adult hippocampal neurogenesis and mental health. *Br Med Bull* 103: 89–114.
57. Singer BH, Gamelli AE, Fuller CL, Temme SJ, Parent JM, et al. (2011) Compensatory network changes in the dentate gyrus restore long-term potentiation following ablation of neurogenesis in young-adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 5437–5442.
58. Shimazu K, Zhao M, Sakata K, Akbarian S, Bates B, et al. (2006) NT-3 facilitates hippocampal plasticity and learning and memory by regulating neurogenesis. *Learn Mem* 13: 307–315.
59. Saxe MD, Battaglia F, Wang JW, Malleret G, David DJ, et al. (2006) Ablation of hippocampal neurogenesis impairs contextual fear conditioning and synaptic plasticity in the dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 17501–17506.
60. van Praag H, Christie BR, Sejnowski TJ, Gage FH (1999) Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 13427–13431.
61. Pujadas L, Gruart A, Bosch C, Delgado L, Teixeira CM, et al. (2010) Reelin regulates postnatal neurogenesis and enhances spine hypertrophy and long-term potentiation. *J Neurosci* 30: 4636–4649.
62. Chiang MY, Misner D, Kempermann G, Schikorski T, Giguere V, et al. (1998) An essential role for retinoid receptors RAR β and RXR γ in long-term potentiation and depression. *Neuron* 21: 1353–1361.
63. Blomhoff R (1994) Transport and metabolism of vitamin A. *Nutr Rev* 52: S13–23.
64. Zhang YR, Zhao YQ, Huang JF (2012) Retinoid-binding proteins: similar protein architectures bind similar ligands via completely different ways. *PLoS One* 7: e36772.
65. Haller J, Weggemans RM, Lammi-Kecfe CJ, Ferry M (1996) Changes in the vitamin status of elderly Europeans: plasma vitamins A, E, B-6, B-12, folic acid and carotenoids. *SENECA Investigators. Eur J Clin Nutr* 50 Suppl 2: S32–46.
66. Borel P, Mekki N, Boirie Y, Partier A, Alexandre-Gouabau MC, et al. (1998) Comparison of the postprandial plasma vitamin A response in young and older adults. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 53: B133–140.
67. Azais-Braesco V, Dodeman I, Delpal S, Alexandre-Gouabau MC, Partier A, et al. (1995) Vitamin A contained in the lipid droplets of rat liver stellate cells is substrate for acid retinyl ester hydrolase. *Biochim Biophys Acta* 1259: 271–276.
68. Ong DE (1994) Cellular transport and metabolism of vitamin A: roles of the cellular retinoid-binding proteins. *Nutr Rev* 52: S24–31.
69. Giguere V, Evans RM (1990) Identification of receptors for retinoids as members of the steroid and thyroid hormone receptor family. *Methods Enzymol* 189: 223–232.
70. Maden M, Ong DE, Summerbell D, Chytil F (1988) Spatial distribution of cellular protein binding to retinoic acid in the chick limb bud. *Nature* 335: 733–735.
71. Perez-Castro AV, Toth-Rogler LE, Wei LN, Nguyen-Huu MC (1989) Spatial and temporal pattern of expression of the cellular retinoic acid-binding protein and the cellular retinoid-binding protein during mouse embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 8813–8817.
72. Polidori MC (2004) Oxidative stress and risk factors for Alzheimer's disease: clues to prevention and therapy. *J Alzheimers Dis* 6: 185–191.
73. Rinaldi P, Polidori MC, Metastasio A, Mariani E, Mattioli P, et al. (2003) Plasma antioxidants are similarly depleted in mild cognitive impairment and in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 24: 915–919.
74. Boylan JF, Gudas LJ (1991) Overexpression of the cellular retinoic acid binding protein-I (CRABP-I) results in a reduction in differentiation-specific gene expression in F9 teratocarcinoma cells. *J Cell Biol* 112: 965–979.
75. Boylan JF, Gudas LJ (1992) The level of CRABP-I expression influences the amounts and types of all-trans-retinoic acid metabolites in F9 teratocarcinoma stem cells. *J Biol Chem* 267: 21486–21491.
76. Arfaoui A, Nasri I, Boulbaroud S, Ouichou A, Mesfioui A (2009) Effect of vitamin A deficiency on retinol and retinyl esters contents in rat brain. *Pak J Biol Sci* 12: 939–948.
77. Arfaoui A, Lobo MV, Boulbaroud S, Ouichou A, Mesfioui A, et al. (2012) Expression of retinoic acid receptors and retinoid X receptors in normal and vitamin A deficient adult rat brain. *Ann Anat*.
78. Goodman AB, Pardee AB (2003) Evidence for defective retinoid transport and function in late onset Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 2901–2905.
79. Goodman AB (2006) Retinoid receptors, transporters, and metabolizers as therapeutic targets in late onset Alzheimer disease. *J Cell Physiol* 209: 598–603.
80. Corcoran JP, So PL, Maden M (2004) Disruption of the retinoid signalling pathway causes a deposition of amyloid beta in the adult rat brain. *Eur J Neurosci* 20: 896–902.
81. Husson M, Enderlin V, Delacourte A, Ghemini N, Alfoss S, et al. (2006) Retinoic acid normalizes nuclear receptor mediated hypo-expression of proteins involved in beta-amyloid deposits in the cerebral cortex of vitamin A deprived rats. *Neurobiol Dis* 23: 1–10.



Retinoic acid modulates intrahippocampal levels of corticosterone in middle-aged mice: consequences on hippocampal plasticity and contextual memory

Damien Bonhomme^{1,2}, Véronique Pallet^{1,2}, Gaele Dominguez^{3,4}, Laure Servant^{1,2}, Nadia Henkous³, Pauline Lafenêtre^{1,2}, Paul Higeret^{1,2}, Daniel Béracochéa³ and Katia Touyarot^{1,2}*

¹ INRA, Nutrition et Neurobiologie Intégrée (NutriNeuro), UMR 1286, Bordeaux, France

² Université de Bordeaux, Nutrition et Neurobiologie Intégrée (NutriNeuro), UMR 1286, Bordeaux, France

³ CNRS, Institut de Neurosciences Cognitives et Intégratives d'Aquitaine, UMR 5287, Talence, France

⁴ INSERM, U-930, Université François Rabelais, Tours, France

Edited by:

Emil C. Toescu, Birmingham University, UK

Reviewed by:

Uwe-Karsten Hanisch, University of Göttingen, Germany

Ashok Kumar, University of Florida, USA

*Correspondence:

Katia Touyarot, INRA, Nutrition et Neurobiologie Intégrée (NutriNeuro), UMR 1286, 146 rue Léo Saignat, F-33000 Bordeaux, France
e-mail: katia.touyarot@enscbp.fr

It is now established that vitamin A and its derivatives, retinoic acid (RA), are required for cognitive functions in adulthood. RA hyposignaling and hyperactivity of glucocorticoid (GC) pathway appear concomitantly during aging and would contribute to the deterioration of hippocampal synaptic plasticity and functions. Furthermore, recent data have evidenced counteracting effects of retinoids on GC signaling pathway. In the present study, we addressed the following issue: whether the stimulation of RA pathway could modulate intrahippocampal corticosterone (CORT) levels in middle-aged mice and thereby impact on hippocampal plasticity and cognitive functions. We firstly investigated the effects of vitamin A supplementation and RA treatment in middle-aged mice, on contextual serial discrimination task, a paradigm which allows the detection of early signs of age-related hippocampal-dependent memory dysfunction. We then measured intrahippocampal CORT concentrations by microdialysis before and after a novelty-induced stress. Our results show that both RA treatment and vitamin A supplementation improve “episodic-like” memory in middle-aged mice but RA treatment appears to be more efficient. Moreover, we show that the beneficial effect of RA on memory is associated to an increase in hippocampal PSD-95 expression. In addition, intrahippocampal CORT levels are reduced after novelty-induced stress in RA-treated animals. This effect cannot be related to a modulation of hippocampal 11 β -HSD1 expression. Interestingly, RA treatment induces a modulation of RA receptors RAR α and RAR β expression in middle-aged mice, a finding which has been correlated with the amplitude of intrahippocampal CORT levels after novelty-induced stress. Taken together, our results suggest that the preventive action of RA treatment on age-related memory deficits in middle-aged mice could be, at least in part, due to an inhibitory effect of retinoids on GC activity.

Keywords: vitamin A, retinoic acid, corticosterone, memory, hippocampal plasticity

INTRODUCTION

Vitamin A, through its active metabolite retinoic acid (RA), plays a key role in cognitive functions and more specifically in hippocampus-dependent memory (Lane and Bailey, 2005; McCaffery et al., 2006; Olson and Mello, 2010). Hippocampal function in memory is dependent on plastic changes in synaptic strength, numbers of synapses and neurons, all of which can be modulated by RA (McCaffery et al., 2006). RA regulates gene expression including plasticity-related genes through binding to specific nuclear receptors: RA receptors (RARs) or retinoic X receptors (RXRs; Marill et al., 2003). When the RARs are functionally removed by mutation in mice, deficits both in long-term potentiation and in hippocampal-dependent memory tasks are observed (Chiang et al., 1998; Wietrzyk et al., 2005). These deleterious effects have been also evidenced by using the vitamin A deficiency (VAD) model in rats and mice, a nutritional

approach leading to a specific hyposignaling of RA signaling pathway (Cocco et al., 2002; Etchamendy et al., 2003; Bonnet et al., 2008). The disruption of retinoid signaling pathway that result from a hypoexpression of some retinoid receptors in target tissues including the hippocampus, occurs naturally during aging in rodents and humans (Enderlin et al., 1997; Etchamendy et al., 2001; Feart et al., 2005; Mingaud et al., 2008; Touyarot et al., 2013). Moreover, it is well established that this RA hyposignaling contributes to the deterioration of hippocampal plasticity and memory processes during aging and these deleterious effects could be reversed by a vitamin A supplementation or RA treatment (Etchamendy et al., 2001; Mingaud et al., 2008; Touyarot et al., 2013).

Although the involvement of retinoids in the modulation of hippocampal plasticity and functions has been well described in aged rodents, molecular mechanisms underlying

these effects remain unclear. The hippocampus is a prime target for glucocorticoids (GCs) which bind to abundant mineralocorticoid and GC receptors (MRs and GRs, respectively), known to be involved in the control of hippocampal plasticity and functions (Oitzl and de Kloet, 1992). During aging, hyposignaling of vitamin A pathway occurs concomitantly with hyperactivity of GC pathway leading to excess plasma levels of GCs [cortisol for humans and corticosterone (CORT) for rodents; Born et al., 1995; Tronche et al., 2010] probably due to alterations in the regulation of hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis (Mizoguchi et al., 2009). However, although elevated levels of plasma CORT have been largely hypothesized to contribute to age-related memory decline (Cameron and Gould, 1994; Lupien et al., 1998; Yau and Seckl, 2012), few studies focus on the measurement of intrahippocampal CORT levels in aged rodents in relation to memory retrieval performance. Interestingly, it has been recently shown that stress-induced intrahippocampal CORT rise in middle-aged rats was associated with memory impairments in a hippocampal-dependent memory task (Chauveau et al., 2009b) that has been previously shown to be affected in middle-aged mice (Celerier et al., 2004; Beracochea et al., 2008a,b; Chauveau et al., 2009a,b; Pierard et al., 2009; Tronche et al., 2010). The magnitude of intracellular CORT action in the rodent hippocampus is thought to be determined by the hippocampal activity of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11 β -HSD1), an enzyme that regenerates active CORT within cells, but also by free CORT circulating in blood and delivered to the brain (Seckl, 1997). Thus, both the hyperactivity of hippocampal 11 β -HSD1 and the alterations of HPA axis leading to elevated plasma CORT, have been correlated with impairments in hippocampal-dependent memory tasks during aging (Yau et al., 2001; Holmes et al., 2010; Yau and Seckl, 2012).

While the antagonism between GCs and RA pathways has been suggested in few studies using different cell types (Paez-Pereda et al., 2001; Aubry and Odermatt, 2009; Brossaud et al., 2013), no study has scrutinized the regulation of GCs activity by retinoids and its impact on cognitive functions in aged animals. Interestingly, inhibitory effects of RA and vitamin A supplementation have been evidenced on the expression and the activity of 11 β -HSD1, in differentiated C2C12 myotubes (Aubry and Odermatt, 2009) and in obese rats liver (Sakamuri et al., 2011). Finally, it has been recently evidenced an increased HPA axis activity in basal and stress conditions associated with an up-regulation of the hippocampal expression of 11 β -HSD1 in vitamin A deficient LOU/C rats, which have been normalized by RA treatment (Arvy et al., 2013).

Altogether, these data suggested counteracting effects between RA and GCs pathways. In the present study, we addressed whether the stimulation of RA pathway could modulate intrahippocampal CORT levels in middle-aged mice and thereby modify hippocampal plasticity and cognitive functions. We first compared the effects of vitamin A supplementation (20 IU/g retinol, 2 months) and RA treatment (150 μ g/kg, 5 days) on memory retrieval of the contextual serial discrimination (CSD) task in middle-aged mice. Thus, we show that short-term RA treatment in middle-aged mice induced an improvement on memory retrieval associated with an increased hippocampal PSD-95 (postsynaptic scaffolding protein

95 kDa) mRNA expression, used as a marker of synaptic plasticity. Hence, we measured intrahippocampal CORT concentrations (by microdialysis), in basal conditions and after CSD box-induced stress. We demonstrated for the first time that RA treatment significantly decreased and delayed the stress-induced increase of hippocampal CORT levels observed in middle-aged mice without any effect on basal concentration. Therefore, our results strengthened the hypothesis of a close relationship between vitamin A status and GCs-induced cognitive impairments in middle-aged mice. Thus, acting on vitamin A status could be a good strategy to prevent excess GCs-induced cognitive decline occurring with aging.

MATERIALS AND METHODS

ANIMALS

Middle-aged (Mid-age) C57BL/6 Jico mice (12-month-old) were purchased from Janvier (Le Genest-Saint-Isle, France). They were housed in a collective cage in a room with a constant airflow system, controlled temperature (21–23°C), and a 12-h light/dark cycle. Mice were granted *ad libitum* access to food and water and were randomly divided into two experimental groups. One group ($n = 22$) was fed with a control diet containing 5 IU retinol/g or a vitamin A-enriched diet containing 20 IU retinol/g during 2 months (INRA, Jouy-en-Josas). The second group ($n = 39$) was fed with a control diet containing 5 IU retinol/g (INRA, Jouy-en-Josas) during 2 months and received subcutaneous injections of RA or vehicle. One week prior to the experiments, all animals were individually housed until sacrifice. Mice were handled and deprived during this period: all subjects were daily weighed in order to maintain 90% of their *ad libitum* body weight throughout the behavioral study. All experiments were performed in accordance with the European Communities Council Directives (86/609/EEC) and the French National Committee (87/848) recommendations, and have been approved by the Animal Care and Use Committee of Bordeaux under the N°50120169-A.

DIET

A first group of middle-aged mice (Mid-age, $n = 12$) was fed with a control diet containing 5 IU retinol/g (INRA, Jouy-en-Josas) during 2 months. The second half (Mid-age + Vitamin A, $n = 10$) received the vitamin A-enriched diet (20 IU retinol/g) during the same period. The composition of the control diet was the same as the vitamin A-enriched diet, except for retinol content. The 20 IU diet was chosen on the basis of literature as a moderate supplementation to avoid potential toxicity of hypervitaminosis (for review, see Penniston and Tanumihardjo, 2006). Diets started as soon as mice arrived in the laboratory (i.e., at the age of 12–13 months) and continued throughout the entire experiment.

RA TREATMENT

Middle-aged treated group (12-month-old, $n = 39$) was fed with a control diet containing 5 IU retinol/g (INRA, Jouy-en-Josas) during 2 months and divided into two groups: one group received daily subcutaneous injections of the vehicle (Mid-age + vehicle, $n = 20$), and the second group received RA treatment (Mid-age + RA, $n = 19$). RA (150 μ g of *all-trans*-RA/kg body weight,

Sigma, France) was dissolved in a mixture (vehicle) containing polyethylene glycol–NaCl–ethanol (70:20:10, by volume) and injected during 5 days. This dose of RA was shown to be effective in reversing age-related hypoexpression of brain signaling and its associated memory impairment in mice (Etchamendy et al., 2001).

EXPERIMENTAL DESIGN

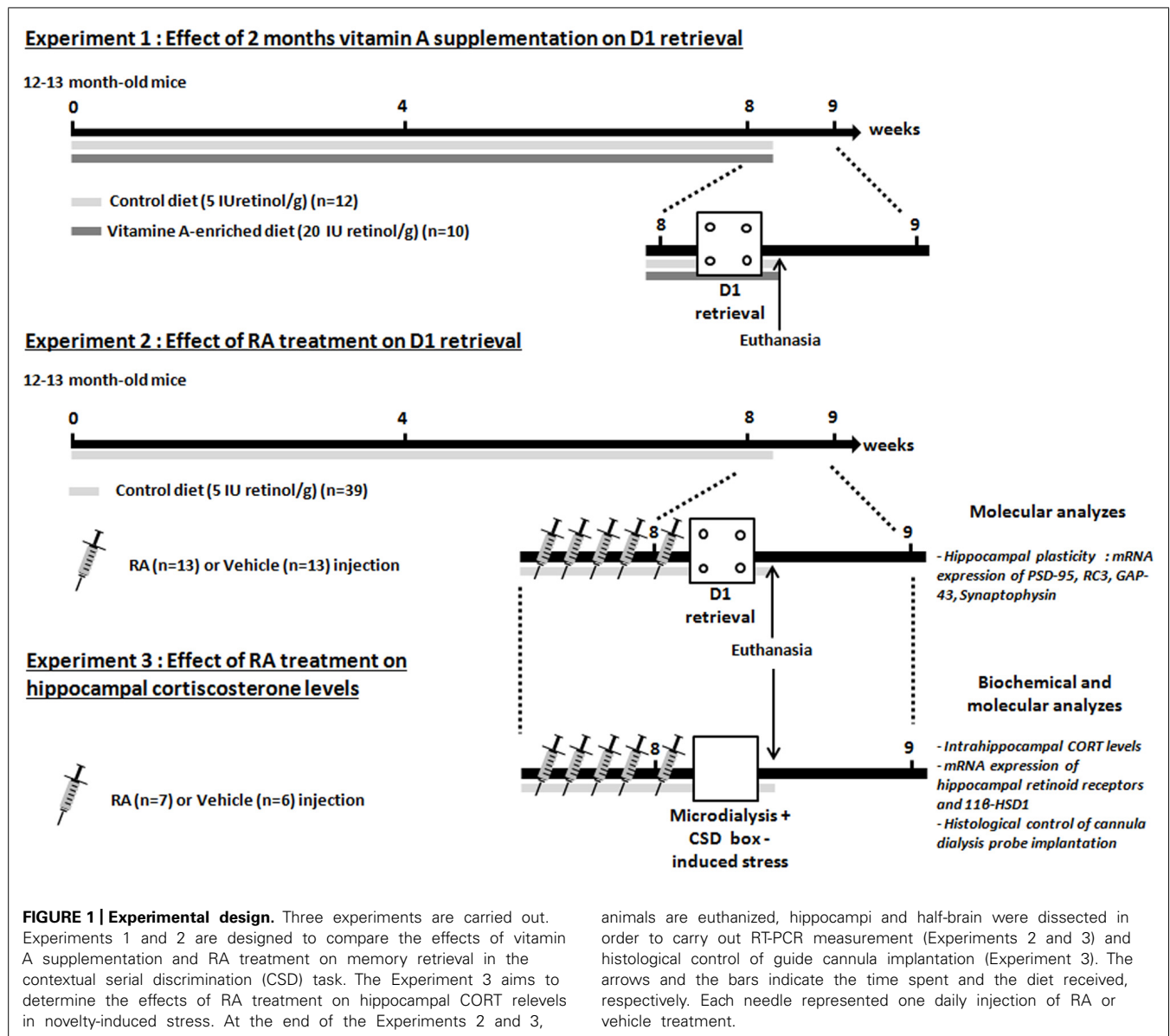
Experimental design displayed in Figure 1

In the first experiment, we tested the effects of 2 months of nutritional vitamin A supplementation administered to 12-month-old mice on memory in the CSD task. Thus, after 2 months of diet, middle-aged mice (Mid-age, $n = 12$) and enriched middle-aged mice (Mid-age + Vitamin A, $n = 10$) were tested in the CSD task.

In the second experiment, we tested the effects of RA treatment during 5 days started at middle-age (14-month-old) on memory

and hippocampal plasticity. Mice were divided into two groups: mice injected with vehicle are referred to as Mid-age + vehicle ($n = 13$) and mice injected with RA are referred to as Mid-age + RA ($n = 13$). Mice were injected 4 days (one injection/day) before the acquisition phase of the CSD task and until the test phase which occurred 24-h later. Twenty minutes after the end of the test phase, all groups were sacrificed and hippocampi were quickly dissected in order to study the expression of plasticity-related RA target genes by quantitative RT-qPCR [Synaptophysin, RC3, GAP-43 (growth-associated protein 43 or neuromodulin), PSD-95].

In the third experiment, the effects of RA treatment were studied on hippocampal CORT release after CSD box-induced stress in 14-month-old mice. Similarly as in Experiment 2, mice were divided into Mid-age + RA ($n = 7$) and Mid-age + vehicle ($n = 6$). After five consecutive days of injections, at the same time of behavioral testing, microdialysis experiment was performed.



After a basal period which lasted 60 min in the microdialysis bowl, animals were placed in the CSD-like box for 10 min and cerebrospinal fluid (CSF) was collected during 105 min post-stress period. Twenty-four hours later, animals were sacrificed and hippocampi were collected in order to evaluate the expression of retinoid receptors (RARs) and GCs-related RA target genes as 11β -HSD1.

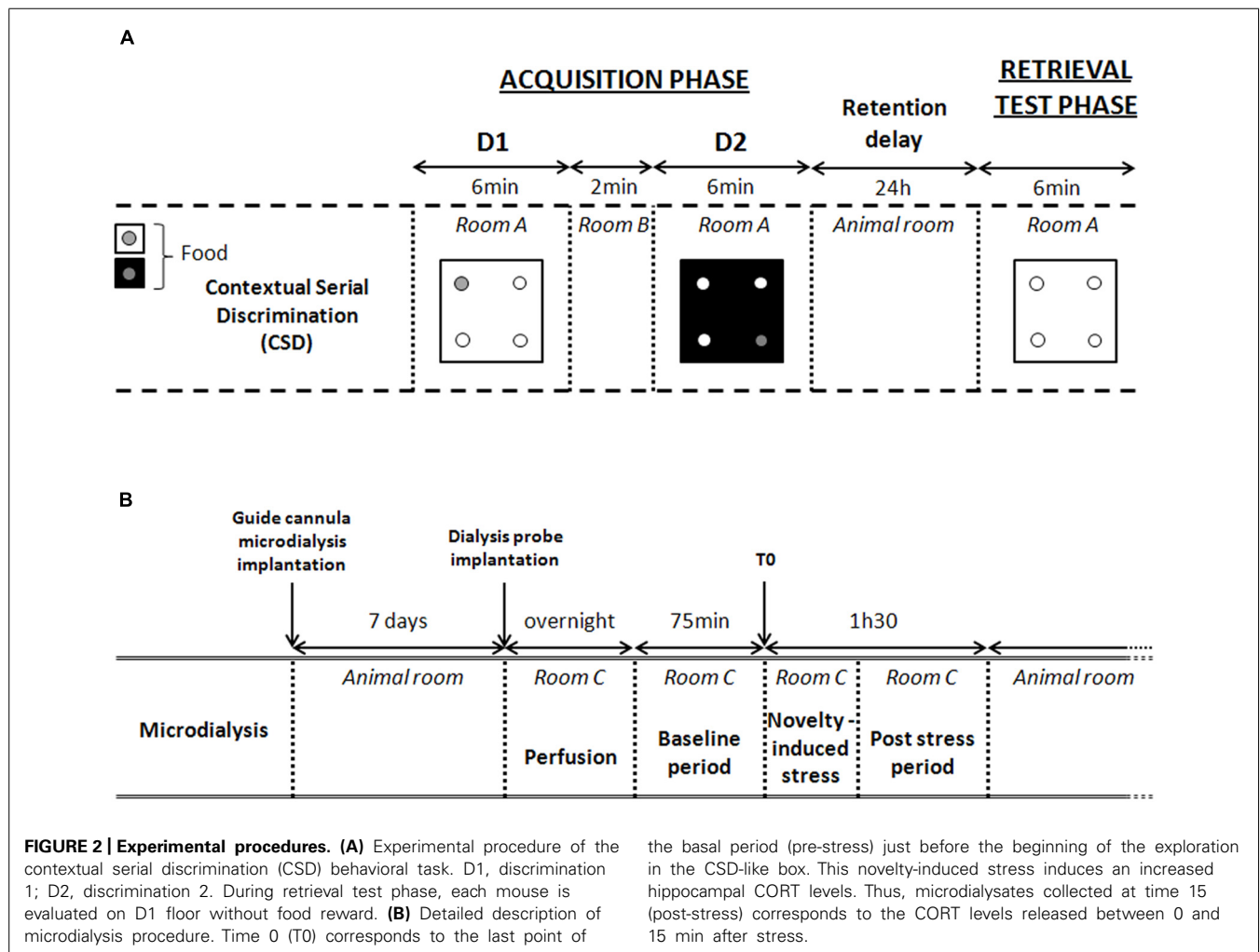
Contextual serial discrimination task apparatus

The CSD task has been extensively described in earlier studies (Celerier et al., 2004; Beracochea et al., 2008a,b; Chauveau et al., 2009a,b). All tests were performed in a 4-hole board apparatus (45 cm \times 45 cm \times 30 cm high) enclosed by gray Plexiglas. The 4-hole board apparatus was placed on the floor of the room (3.0 m \times 3.0 m \times 2.40 m high). The floor of the board was interchangeable (white and rough; black and smooth). On the floor, four holes opening on a food cup (3 cm diameter, 2.5 cm in depth) were located 6 cm away from the side-walls. The apparatus was placed in a room exposed to a 60-dB background noise and a light centered over the apparatus provided 20 lux intensity at the position of the apparatus. The apparatus was cleaned with 95% ethanol, then with water before each mouse behavioral

testing. Data were automatically monitored by photoelectric cells and video recording.

Acquisition phase

In the CSD, the acquisition phase took place in room A where animals learned two consecutive spatial discriminations (D1 and D2; see **Figure 2**). Both discriminations differed in terms of the color and texture of the floor (internal context of the 4-hole board) and were separated by a 2-min delay interval. During this delay, the mouse was returned to its home cage in room B. At the beginning of acquisition and retrieval phases, mice were placed in the center of the 4-hole board in an opaque PVC tube for 5 s to provide the animal with a random start in the apparatus. For D1, ten 20-mg food pellets were available only in one of the four holes on the board for 6 min. Location of the baited hole for D1 was randomized for each subject. For D2, ten 20-mg food pellets were consistently located in the opposite symmetrical hole, for 6 min likewise. The environmental spatial cues were made of colored and striped paper sheets positioned at 1.00 m above the 4-hole board. These allocentric cues remained at the same place for both D1 and D2 discriminations and for the retrieval phase. Thus, both discriminations D1 and D2 differed



only by way of the internal (floor) contextual cues. Both floors were positioned in a mixed random order during the acquisition of the first and second discrimination tasks. At the end of the acquisition phase, mice returned to their home cage in the animal room for 24 h. Only mice having eaten all the pellets during both acquisition sessions were used for the retrieval test phase.

Test phase

Twenty-four hours after the acquisition phase, mice were replaced in the 4-hole board (room A) without any pellets in the apparatus. Mice were placed on the D1 floor and were allowed to freely explore the apparatus for 6 min. Performance was assessed by measuring the number of head-dips in each hole during 6 min.

Measurements

Memory retrieval performance was evaluated through the exploration rates into the different holes. Correct responses were defined as head-dips into the hole previously baited on the same floor-context during the acquisition phase, and were calculated as follows: (head-dips into the baited hole/total number of head-dips in the four holes) \times 100. Interfering responses were defined as head-dips into the hole previously baited on the other floor-context in the acquisition phase and were calculated on same manner as correct responses. Chance level was 25%.

SURGERY AND HISTOLOGY

For Experiment 3, 1 week before the microdialysis study, mice were anesthetized with a ketamine (100 mg/kg body weight)–xylazine (10 mg/kg body weight) solution and placed into a stereotaxic frame. A single guide cannula microdialysis (CMA/7 Microdialysis probe, CMA Microdialysis, Sweden) was implanted randomly in the left or the right hemisphere, in the bottom of the parietal cortex at the following coordinates from the bregma (Paxinos and Franklin, 2001): anteroposterior = $-2000 \mu\text{m}$, lateral = $\pm 1400 \mu\text{m}$, and vertical = $-900 \mu\text{m}$. The guide cannula was fixed with dental cement to the skull. All operated mice were allowed to recover in their home cages in the animal room for at least 7 days before the microdialysis experiment. On the day of experiment, the microdialysis probe was lowered 1 mm below through the guide cannula so that the microdialysis membrane is located into the dorsal hippocampus. At the end of the microdialysis experiment, mice were euthanatized and the half of the brain containing the guide cannula was dissected, washed into a saline solution (NaCl 0.9%) and postfixed in a 4% paraformaldehyde solution. After 3 weeks postfixation period, 50 μm frontal sections were cut on a vibratome (Leica). A cresyl violet stain was used to locate the microdialysis probe with utmost accuracy.

IN VIVO MICRODIALYSIS

Seven days after surgery, a dialysis probe (CMA/7; CMA Microdialysis AB, Sweden; length: 1 mm; molecular cut-off 6 kDa and membrane diameter: 0.24 mm outer diameter) was carefully implanted into the right or left dorsal hippocampus. Mice were then individually housed in a system allowing animals to move freely (CMA/120; CMA Microdialysis AB, Sweden)

overnight. After the overnight perfusion at 0.5 $\mu\text{L}/\text{min}$, freely moving animals were continuously perfused with a sterile-filtered saline solution (Dulbecco's phosphate buffered saline; SIGMA; in g/L: CaCl₂, 0.133; MgCl₂, 0.1; KCl, 0.2; KH₂PO₄, 0.2; NaCl 8.0; Na₂HPO₄, 1.15; pH between 7.1 and 7.5) at a 1- $\mu\text{L}/\text{min}$ flow rate through a micro-infusion pump. Baseline dialysates were collected for 60 min before novelty-induced stress task. During the novelty-induced stress, animals were carefully placed in an open field square box similar to the CSD box (45 cm \times 45 cm \times 30 cm high). After 10 min exploration, animals were then relocated in the microdialysis freely moving chamber for 95 min. Microdialysates were sampled every 15 min using tubes with a dead volume of 1.2 $\mu\text{L}/100 \text{ mm}$ length (CMA Microdialysis AB). Samples were stored at 80°C. Free CORT levels measured in the dialysates (in nM) were expressed as the percentage of the averaged baseline values collected before the injection.

INTRA-HIPPOCAMPAL CORT ASSAY

A commercially prepared Enzyme Immunoassay kit was used to measure HPC CORT concentrations in the microdialysates (Correlate-EIATM, Assay Designs, Ann Arbor, USA) according to the manufacturer's instructions. The sensitivity of the assay was 0.08 nmol/L. Therefore, baseline sample concentration was more than 10-fold superior than sensitivity threshold.

REAL-TIME qPCR ANALYSIS OF TARGET GENE EXPRESSION IN THE HIPPOCAMPUS

The other half of the hippocampus was used to measure gene expression. Extraction of RNA was conducted using an extraction kit (TRIzol reagent, Invitrogen, Saint Aubin, France) according to the manufacturer's instructions. The integrity of the purified RNA was verified using the RNA 6000 Nano LabChip kit in combination with the 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies). The concentrations of RNA were determined by using a nanodrop (ND-1000; Labtech). Using OligodT and random primers (Promega, Charbonnières-les-Bains, France), cDNA was synthesized from 1 μg of RNA with ImPromII reverse transcriptase (Promega, Charbonnières-les-Bains, France) according to the manufacturer protocol. The real-time qPCR was performed using the LightCycler 480 system with a 96-well format (Roche Diagnostics) in a volume, containing 1 \times LightCycler 480 SYBR Green I Master solution, 0.5 μM of each primer and 6 μL of cDNA. The forward and reverse primer sequences are summarized in **Table 1**. The results are expressed as the target/reference ratio divided by the target/reference ratio of the calibrator.

STATISTICAL ANALYSIS

Contextual serial discrimination test and RT-qPCR data were analyzed by a one-way analysis of variance (ANOVA): effect of vitamin A or RA treatment. Comparisons of retrieval performance with chance level were calculated with a one sample *t*-test (with hypothesized mean = chance level = 25%). Hippocampal CORT release was analyzed using a two-way ANOVA with repeated measures: effect of RA treatment and Time. All results were expressed as mean \pm SEM.

Table 1 | Primers used for LightCycler RT-qPCR.

Gene name	Nucleotide sequence 5'–3'	Product length (bp)
GAPDH	F: CCAGTGAGCTTCCCGTTCA R: GAACATCATCCCTGCATCCA	78
Actin	F: AAAACGCAGCTCAGTAACAGTCC R: AGGATGCAGAAGGAGATTACTGC	220
Synaptophysin	F: TCCTTGCATGTGTTTCCTGTCTG R: GCAGTGTTTCGCTTTCATGTGG	137
PSD-95	F: TGGATCACAGGTCGAGAAG R: CTTTGGTAGGCCCAAGGATG	101
RC3	F: CACTCTCCGCTTTTATCTTCTTC R: GCTCCAAGCCAGACGACGATATTC	127
GAP-43	F: GGGGAGTTATCAGTGGTAGC R: GTGATGCACCAGCTGCTGAGG	255
RAR α	F: GGCGAACTCCACAGTCTTAATG R: GCTGGGCAAGTACACTACGAAC	118
RAR β	F: GGGGTATACCTGGTACAAATCTGA R: CAGCTGGGTAAATACACCACGAA	227
RAR γ	F: CCCAAGGATGCTGATGAAAATC R: GCCCTTCTGCTCCCTTAGTG	63
11 β -HSD1	F: GGAAGGTCTCCAGAAGGTAGTGTC R: GAGGCTGCTCCGAGTTCAAG	51

Sequences are shown for forward (F) and reverse (R) primers. GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-like; PSD-95, postsynaptic density protein 95; RC3, neurogranin; GAP-43, growth associated protein 43; RARs, retinoic acid receptors; 11 β -HSD1, 11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1.

RESULTS

EFFECTS OF VITAMIN A SUPPLEMENTATION AND SHORT-TERM RA TREATMENT ON CONTEXTUAL SERIAL DISCRIMINATION MEMORY

In the present experiment, we compared the effects of 2 months of vitamin A supplementation and short-term RA treatment on D1 retrieval in middle-aged mice (**Figure 3**).

Acquisition phase

The acquisition phase of groups tested for D1 was analyzed according to the further random attribution of mice to different diet or treatment conditions (Control vs Vitamin A, Vehicle vs RA). No between-group difference was observed on behavioral measures (number of head-dips into baited holes, total number of head-dips; n.s. in all comparisons – data not shown).

Retrieval test phase – correct responses

As shown in **Figure 3A**, one-way ANOVA of percentage of correct responses in D1 retrieval test revealed no effect of vitamin A supplementation [$F(1,20) = 3.23$, $p = 0.087$; Mid-age + Vitamin A: $38.59 \pm 3.81\%$ vs Mid-age: $30.26 \pm 2.80\%$]. However, the enriched middle-aged group exhibited performances significantly above the chance level (different from 25%; one sample test $p < 0.01$) compared to control middle-aged mice which performed at chance (one sample test $p = 0.087$, n.s.). As shown

in **Figure 3B**, a significant improvement of memory retrieval was observed in middle-aged mice receiving RA treatment compared to the vehicle-treated group [$F(1,24) = 25.32$, $p < 0.001$; Mid-age + RA $50.66 \pm 3.16\%$ vs Mid-age + vehicle: $25.68 \pm 3.82\%$]. In addition, D1 performance of RA-treated mice was significantly above the chance level (one sample test $p < 0.0001$) showing that they accurately remember the previously baited hole, in contrast to vehicle-treated mice.

Retrieval test phase – interfering responses

During retrieval of D1, interfering responses consisted of exploration into the hole baited on discrimination D2. As shown in **Figure 3C**, one-way ANOVA analyzes revealed that vitamin A supplementation does not affect the percentage of responses in the interfering hole [$F(1,20) = 3.18$, $p = 0.90$; Mid-age + Vitamin A: $27.48 \pm 4.29\%$ vs Mid-age $36.98 \pm 3.31\%$]. However, as seen in **Figure 3D**, one-way ANOVA showed that RA-treated mice exhibited significantly less interfering responses than vehicle control mice [$F(1,24) = 15.18$, $p < 0.001$; Mid-age + RA: $21.88 \pm 2.20\%$ vs Mid-age + vehicle: $39.42 \pm 3.93\%$]. In addition, the percentage of responses in the interfering hole was above the chance level for the vehicle-treated mice (one sample test $p = 0.003$) confirming impaired contextual retrieval for D1, whereas RA-treated mice performed at chance (one sample test $p = 0.182$, n.s.).

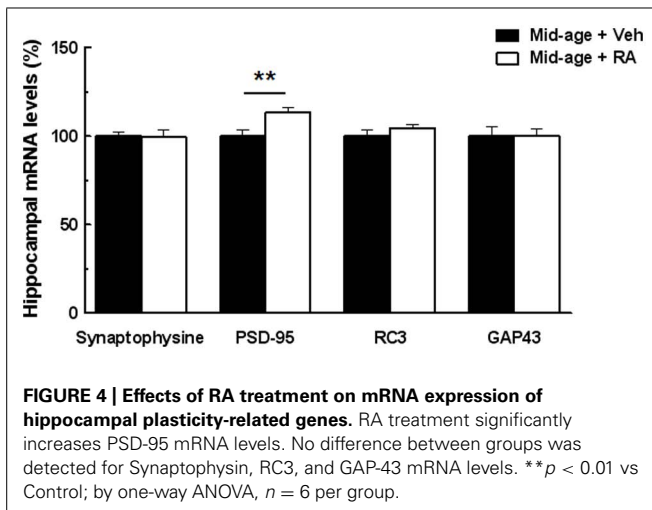
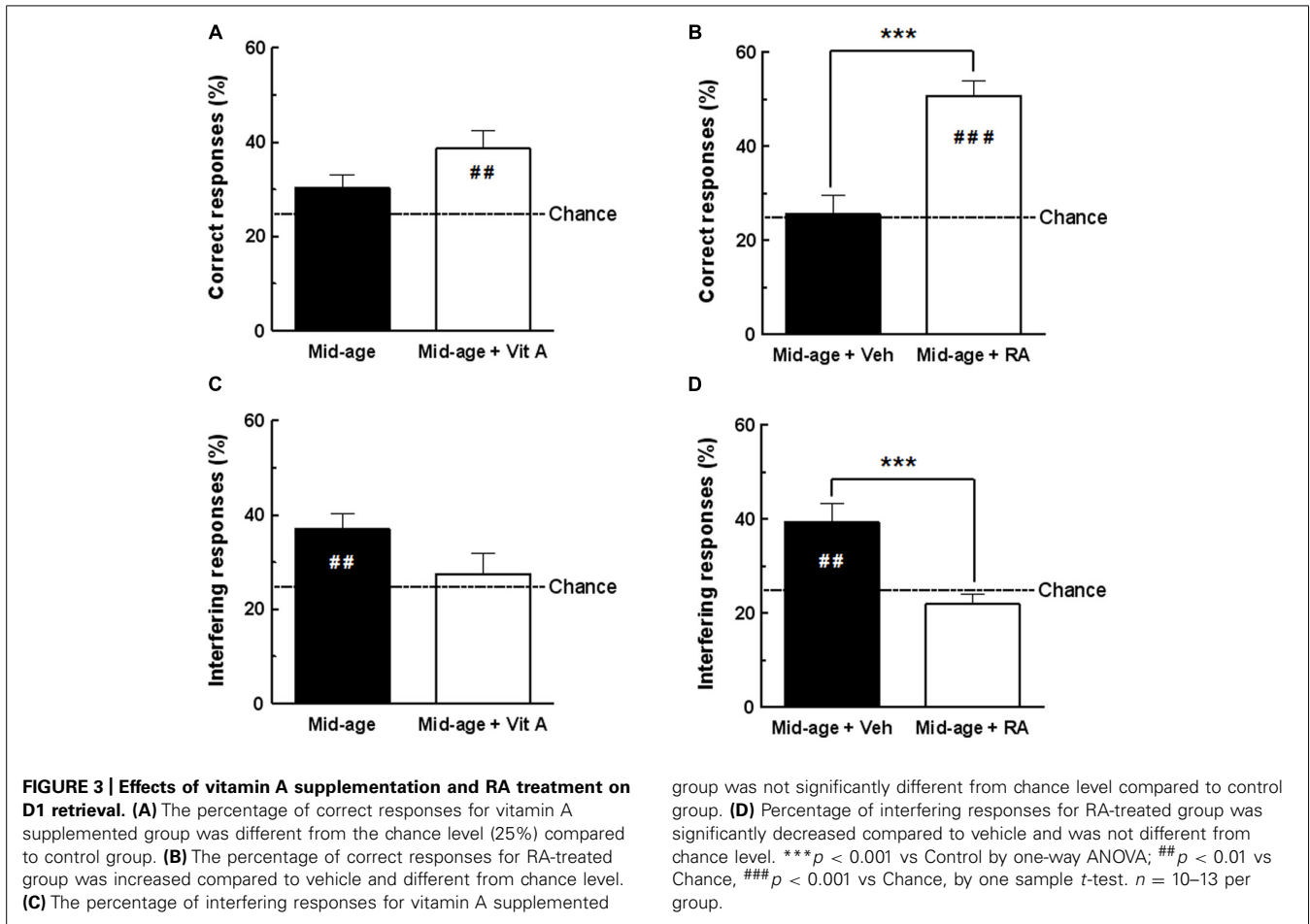
In conclusion, our results demonstrate that both vitamin A supplementation and RA treatment improve memory performances in the CSD task. However, a short-term RA treatment in middle-aged subjects was more efficient to improve retrieval of D1 context than 2 months of vitamin A supplementation. Thus, short-term RA treatment was chosen in our subsequent experiments to study the effects of retinoid pathways stimulation in middle-aged mice on hippocampal CORT levels and hippocampal expression of retinoid-target genes.

EFFECTS OF RA TREATMENT ON HIPPOCAMPAL EXPRESSION OF PLASTICITY-RELATED GENES

In order to study the possible neurobiological mechanisms underlying the improvement of memory performances in RA-treated mice, we tested whether RA treatment can modulate expression of some hippocampal plasticity genes such as synaptophysin, PSD-95, RC3 (neurogranin), and GAP-43, measured 20 min after the end of the CSD task. As shown in **Figure 4**, one-way ANOVA performed on mRNA expression of hippocampal PSD-95 revealed an effect of RA treatment [$F(1,9) = 10.46$, $p = 0.01$]. Indeed, an increase of PSD-95 expression (+13%) was found in RA-treated mice. However, no effect of RA treatment was found on the mRNA expression of synaptophysin, RC3, and GAP-43 [$F(1,9) = 0.008$, n.s., $F(1,9) = 1.90$, n.s., and $F(1,9) = 0.009$, n.s., respectively].

EFFECTS OF RA TREATMENT ON HIPPOCAMPAL CORT RELEASE

We studied the involvement of hippocampal CORT in the effects of RA treatment on hippocampal plasticity and functions in middle-aged mice. Thus, CORT levels in hippocampal dialyzates were analyzed in basal conditions and after CSD box-induced stress according to the further random attribution of mice to vehicle or RA-treated groups.



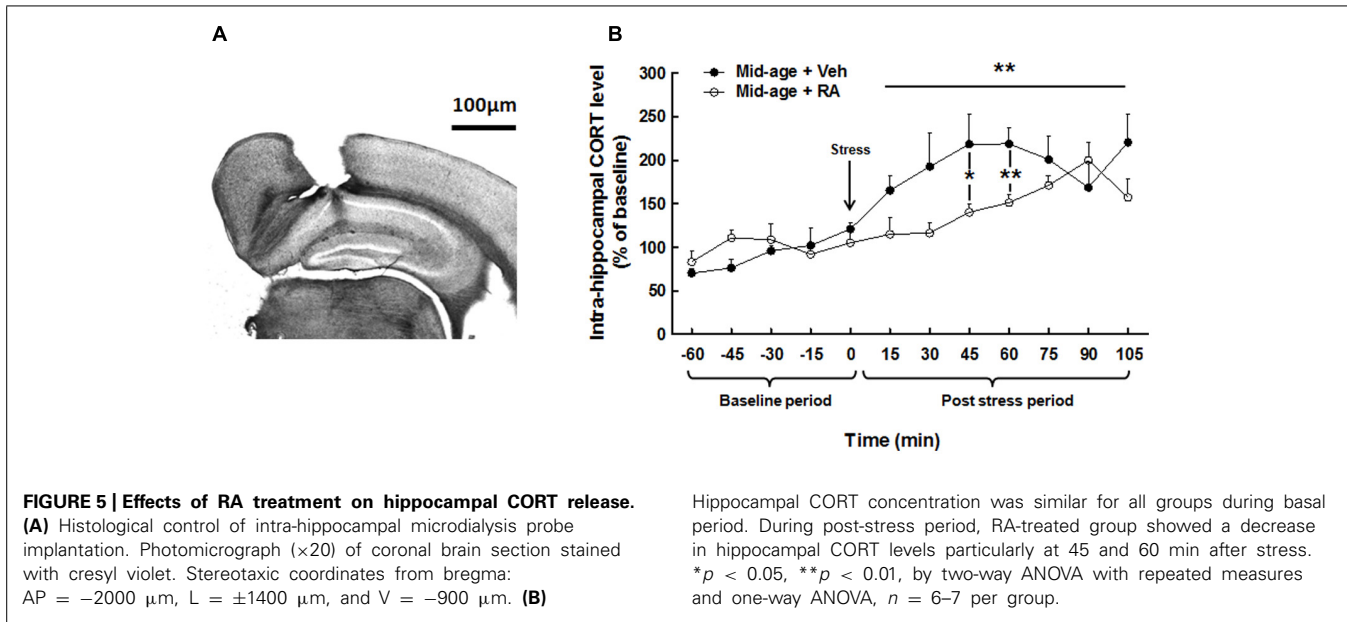
As shown in **Figure 5A**, a photomicrograph of coronal brain section stained with cresyl violet from a typical mouse shows that microdialysis probe were located inside the dorsal hippocampus, between CA1 and DG areas. **Figure 5B** represents CORT levels in the dorsal hippocampus and results are expressed in percentage of variation of baseline.

Basal hippocampal corticosterone levels

Two-way ANOVA on hippocampal CORT levels (**Figure 5B**) along the basal period (-60 to 0 min) evidenced no global effect of treatment [$F(1,11) = 1.77$, n.s.], nor interaction treatment \times time [$F(4,44) = 1.00$, n.s.] showing no differences in basal hippocampal CORT between groups (Mid-age + vehicle: 1.11 ± 0.20 nM vs Mid-age + RA: 1.61 ± 0.37 nM).

Hippocampal corticosterone levels after CSD box-induced stress

Two-way ANOVA performed on hippocampal CORT released along the post-stress period (from 0 to 105 min) revealed a global effect of RA treatment [$F(1,11) = 4.54$, $p = 0.05$], an effect of time [$F(7,77) = 4.43$, $p < 0.0001$] with an interaction treatment \times time [$F(7,77) = 2.47$, $p < 0.05$]. Firstly, as compared to the last pre-stress sample ($121.08 \pm 7.66\%$; time 0), stress induced a fast and rapid increase in CORT levels from 15 min after stress ($165.36 \pm 16.58\%$) to 105 min ($220.55 \pm 32.15\%$) in vehicle-treated mice. Moreover, a faster increase in CORT levels was observed 15 min after CSD box-induced stress in control middle-aged mice as compared to RA-treated middle-aged mice [$F(1,11) = 3.91$, $p = 0.07$; Mid-age + vehicle: $165.36 \pm 16.58\%$ vs Mid-age + RA: $114.93 \pm 18.80\%$] as well as 30 min [$F(1,11) = 4.04$, $p = 0.07$; Mid-age + vehicle: $192.71 \pm 38.7\%$ vs Mid-age + RA: $116.50 \pm 11.97\%$], 45 min



[$F(1,11) = 5.56$, $p < 0.05$; -78% between Mid-age + vehicle: $218.48 \pm 34.42\%$ and Mid-age + RA: $140.26 \pm 9.22\%$] and 60 min [$F(1,11) = 11.43$, $p < 0.01$; -77% between Mid-age + vehicle: $218.8 \pm 18.88\%$ and Mid-age + RA: $151.36\% \pm 9.05\%$] after stress delivery.

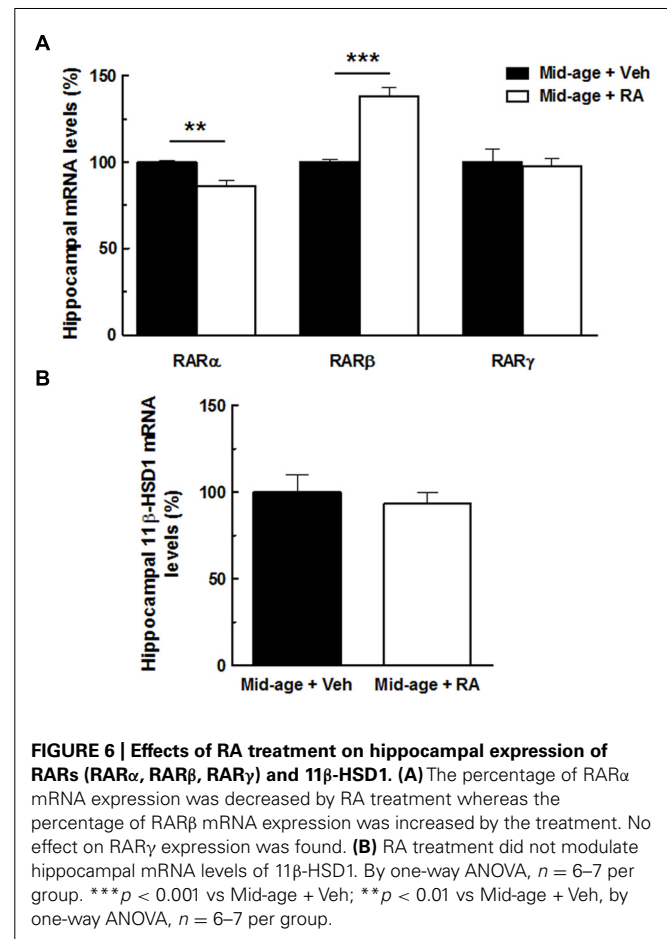
Thus, CSD box-induced stress significantly increased hippocampal CORT levels in middle-aged rats but the stress-induced CORT rise was lower and delayed for an extended period of time in RA-treated middle-aged mice.

EFFECTS OF RA TREATMENT ON HIPPOCAMPAL EXPRESSION OF RETINOID RECEPTORS AND 11 β -HSD1

In order to study the relationships between retinoid and GC pathway, hippocampal expression of RARs and 11 β -HSD1 was assessed in middle-aged mice. For gene expression, results are expressed in percentage of variation by comparison to vehicle-treated group.

As seen in **Figure 6A**, one-way ANOVA performed on hippocampal RAR α mRNA expression showed an effect of RA treatment [$F(1,10) = 19.16$, $p < 0.01$]. Indeed, RA treatment induced a decreased RAR α expression (-14%) compared to vehicle-treated mice. By contrast, hippocampal RAR β mRNA expression is increased by 38% compared to vehicle-treated mice [ANOVA, effect of RA treatment, $F(1,10) = 53.88$, $p < 0.001$]. Finally, no effect of RA treatment was detected on hippocampal RAR γ expression [$F(1,10) = 0.55$, n.s.]. As shown in **Figure 6B**, hippocampal mRNA expression of 11 β -HSD1 was not affected by RA treatment [$F(1,10) = 0.32$, n.s.].

Moreover, correlations analyzes were performed between hippocampal expression of RARs and intrahippocampal CORT levels in order to study interactions between RA and GCs signaling pathways (**Figure 7**). Correlation analyzes between hippocampal expression of RAR α and CORT levels showed that a decreased expression of RAR α was associated to a lower hippocampal CORT release 45 and 60 min post-stress (**Figures 7A,B**, $r = 0.55$, $p < 0.05$ and $r = 0.59$, $p < 0.05$, respectively).



Moreover, correlation analyzes revealed a strong negative correlation between intrahippocampal CORT levels and hippocampal expression of RAR β 45 and 60 min post-stress (**Figures 7C,D**,

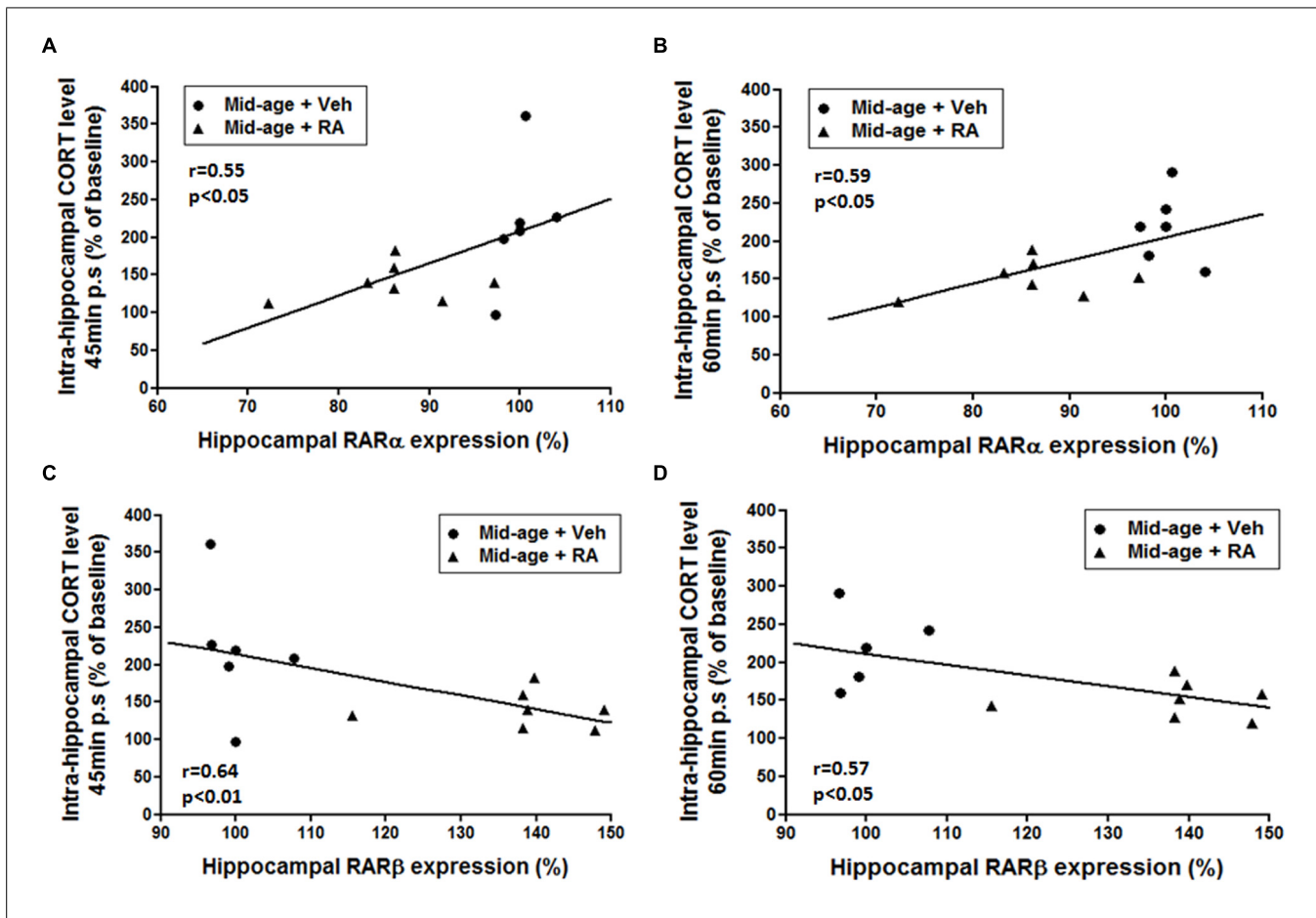


FIGURE 7 | Relationships between hippocampal expression of RARs (RAR α , RAR β) and intrahippocampal CORT levels. (A,B) Correlation analyzes between RAR α and CORT levels. Intrahippocampal CORT levels [45 min (A) and 60 min (B) post-stress] positively correlated with RAR α hippocampal mRNA expression ($r = 0.55$, $p < 0.05$ and

$r = 0.59$, $p < 0.05$, respectively). (C,D) Correlation analyzes between RAR β and CORT levels. Intrahippocampal CORT levels [45 min (C) and 60 min (D) post-stress] negatively correlated with RAR β hippocampal mRNA expression ($r = 0.64$, $p < 0.01$ and $r = 0.57$, $p < 0.05$, respectively).

$r = 0.64$, $p = 0.01$ and $r = 0.57$, $p < 0.05$, respectively): low intrahippocampal CORT was associated with elevated expression of RAR β . Finally, no significant correlation was found between hippocampal CORT levels and hippocampal RAR γ expression.

Thus, these data sustained the idea that the modulation of RA signaling pathway by RA treatment during mid-life can modulate GCs activity in the hippocampus.

DISCUSSION

The aim of this study was to explore the involvement of retinoids in the modulation of intrahippocampal CORT levels in middle-aged mice and its impact on hippocampal plasticity and functions. Middle-aged mice treated with five daily consecutive injections of RA retrieve better D1 discrimination in CSD task than mice fed with 2 months of vitamin A supplementation showing that RA treatment seems to be more efficient than vitamin A supplementation. Moreover, we show that the improvement of D1 retrieval by RA treatment is associated with an increased hippocampal PSD-95

mRNA expression, one of plasticity-related RA target genes. Interestingly, RA treatment can decrease and delay the stress-induced increase in dorsal hippocampus CORT rise in middle-aged mice. This effect cannot be related to a modulation of hippocampal 11 β -HSD1 expression. In addition, RA treatment induces a modulation of RA receptors RAR α and RAR β expression in middle-aged mice, which has been correlated with intrahippocampal CORT levels after CSD-box-induced stress, showing that retinoid signaling could be an important modulator of intrahippocampal GCs activity and thereby hippocampal plasticity and functions.

EFFECTS OF RETINOIC ACID TREATMENT ON CSD TASK AND HIPPOCAMPAL EXPRESSION OF PLASTICITY-RELATED TARGET GENES AT MIDDLE-AGE

We first explored the effects of vitamin A supplementation and RA treatment on CSD task that allows the detection of early signs of age-related hippocampal-dependent memory deficits (Chauveau et al., 2010; Tronche et al., 2010). Studies in middle-aged mice have important implications for the treatment of the non-pathological

age-associated cognitive decline, as well as mild cognitive impairment (Pepeu, 2004). The effects of stimulation of retinoid pathway on memory performance have not yet been tested in middle-aged rodents. Thus, our study demonstrates for the first time that a mid-life RA treatment is efficient to correct “early” age-related hippocampal-dependent memory deficits. The ability of cells to convert vitamin A into RA, the active metabolite, and therefore to initiate retinoid signaling would be altered during aging (Azais-Braesco et al., 1995). Thus, injections of RA at middle-age, would be more efficient than 2 months of nutritional vitamin A supplementation involving metabolism steps. Our present results show that 2 months of vitamin A supplementation with a dose of 20 IU retinol/g is not sufficient to observe preventive effects on memory processes. However, a recent study of our team has shown that the stimulation of retinoid pathway by 4 months of vitamin A supplementation allowed the correction of hippocampal-dependent memory deficits in aged rodents but in this study, the animals were fed with higher content of vitamin A (45 IU retinol/g) and for a longer time which would be an efficient way of improving metabolism (Etchamendy et al., 2001; Drapeau et al., 2003, 2007; Mingaud et al., 2008; Touyarot et al., 2013).

In our current study, the memory retrieval improvement of D1 observed in middle-aged mice after RA treatment can be ascribed to an improvement of hippocampal-dependent memory function. Indeed, mice with lesion of the dorsal hippocampus exhibited an impaired memory retrieval pattern in the CSD task similar to that of middle-aged mice of the present study (Chauveau et al., 2009b). Deficits in hippocampal-dependent tasks reported in middle-aged rats (Frick et al., 1995; Markowska and Breckler, 1999; Kadish et al., 2009), could result from dysfunction of hippocampal plasticity (Kaczorowski and Disterhoft, 2009). Thus, the modulation of hippocampal plasticity, one plausible mechanism underlying hippocampal memory function would be critical for retention of D1 discrimination in the CSD task. The genes we chose to study are hippocampal plasticity-related RA target genes and all major components of presynaptic and postsynaptic density. Thus, we show that RA treatment is efficient not only to improve hippocampal-dependent memory processes but also hippocampal synaptic plasticity as evaluated by the expression of some plasticity-related RA target genes in middle-aged mice. Interestingly, we demonstrate that RA treatment at mid-life increased hippocampal PSD-95 mRNA expression, known to be involved in memory processes (Mingaud et al., 1998; Carlisle et al., 2008). PSD-95 recruits and clusters *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) and α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors, ion channels, cytoskeletal components, and signal transduction molecules in response to synaptic activity (Beique et al., 2006; Vickers et al., 2006). During spatial learning and memory formation, PSD-95 is recruited to synaptic lipid rafts, suggesting that regulated localization as well as expression of this protein is a necessary component of synaptic plasticity (Delint-Ramirez et al., 2008). Alterations in the content of PSD-95 in the hippocampal formation have been observed in aged-learning impaired rats (Nyffeler et al., 2007). In addition, a positive correlation between the decreased expression levels of hippocampal PSD-95 and the decline of performance in a hippocampal-dependent

spatial memory task have been shown (VanGuilder et al., 2011). Thus, we proposed that the promotion of hippocampal PSD-95 expression in middle-aged mice treated with RA could be one of the plausible mechanisms by which RA treatment might exert promnesic effects in the CSD task. In addition, we show that RA treatment on middle-aged mice does not modify Synaptophysin, RC3, and GAP-43 hippocampal mRNA expression. It has been demonstrated to date that RA treatment or vitamin A supplementation can increase levels expression of RC3 (Etchamendy et al., 2001) and GAP-43 (Mingaud et al., 2008) during aging. However, no effect of vitamin A supplementation nor RA treatment has been evidenced on hippocampal GAP-43 mRNA expression in middle-aged mice (Mingaud et al., 2008) suggesting thereby that the modulation of retinoid status at mid-life would not be efficient to induce changes in these plasticity-related genes and would be more specific to PSD-95.

EFFECTS OF RETINOIC ACID TREATMENT ON INTRAHIPPOCAMPAL CORTICOSTERONE LEVELS: INVOLVEMENT OF RETINOIC ACID RECEPTORS

In order to better understand some potential mechanisms involved in the regulation of hippocampal plasticity and memory processes in the CSD task by RA treatment, we have tested whether RA signaling pathway could be a regulator of intrahippocampal CORT levels in middle-aged mice. Our study shows that RA treatment does not influence basal levels of intrahippocampal CORT but reduces and delays the CORT rise after CSD-induced stress in middle-aged mice.

Therefore, in order to establish a link between vitamin A status in middle-aged mice and hippocampal CORT rise after stress conditions, we measured the expression of hippocampal retinoid receptors. We show that the low CORT release in middle-aged RA-treated mice has been associated with a decrease in hippocampal RAR α and an increase in RAR β mRNA expression levels thus showing that retinoid signaling could be an important modulator of intrahippocampal GCs activity. It has been shown that the hippocampal expression of retinoic receptors is a good indicator of vitamin A status and intracellular availability of RA. Indeed, several studies have demonstrated age-related decreases in mRNA expression or protein levels of retinoid receptors in mice and rat brain (Enderlin et al., 1997; Etchamendy et al., 2001; Feart et al., 2005; Mingaud et al., 2008; Dyal et al., 2010) indicating a decreased bioavailability of the ligand. More specifically, age-induced decreased RAR β in the whole brain has been associated with memory deficits and all these effects can be normalized by RA treatment (Etchamendy et al., 2001). According to these results, we evidence that RA treatment increases hippocampal expression of RAR β in middle-aged while RAR α is decreased. More importantly, we have shown correlations between hippocampal expression of these retinoid receptors and hippocampal CORT levels. Thus, our results suggested that RA treatment-induced up-regulation of hippocampal RAR β but also down-regulation of hippocampal RAR α could contribute to limit hippocampal CORT rise. These results further substantiated our hypothesis of a close relationship between hippocampal retinoid and GC pathways.

POSSIBLE MECHANISMS INVOLVED IN THE EFFECTS OF RA TREATMENT ON INTRAHIPPOCAMPAL CORT LEVELS

11 β -HSD1 hypothesis

The magnitude of intracellular GCs action is thought to be determined by the activity of 11 β -HSD1 (Seckl, 1997), that is increased during aging in hippocampus and correlated with impaired cognitive performance in the water maze (Holmes et al., 2010). Indeed, 11 β -HSD1 regenerates active GCs from their inactive forms, in specific areas in the adult brain, such as the hippocampus, thereby effectively amplifying intracellular GC levels before they bind to MRs and/or GRs (Holmes et al., 2003). Interestingly, inhibitory effects of RA and vitamin A supplementation have been shown on the expression and the activity of 11 β -HSD1, in differentiated C2C12 myotubes (Aubry and Odermatt, 2009), in obese rats liver (Sakamuri et al., 2011) and in vitamin A deficient rats hippocampus (Arvy et al., 2013). Thus, we suggest that the effect of RA treatment on hippocampal CORT levels could directly be mediated, through retinoid receptors which act as transcription factors. However, our results show that hippocampal 11 β -HSD1 expression is not modulated by RA treatment in middle-aged mice suggesting that other mechanisms would lead to a modulation of hippocampal CORT levels.

Modulation of HPA axis

Another hypothesis would be a dysfunctioning of the HPA axis in response to stress in middle-aged mice and a subsequent deregulation of hippocampal CORT levels (Herman et al., 2001). Brain aging has been construed as being conditioned by an excessive plasma GC secretion leading to damages on brain areas, such as hypothalamus or hippocampus, involved in the control of the activity of the HPA axis (Cameron and Gould, 1994; Lupien et al., 1998; Yau and Seckl, 2012). More recently, an increase in HPA axis activity was shown in vitamin A deficient rats LOU/C, exhibiting retinoid hyposignaling pathway, leading to elevated total plasma CORT level in basal and stress conditions, which is restored to control level by RA treatment (Arvy et al., 2013). However, contrary to this result, it has been shown that chronic RA treatment with high doses (2 mg/kg) induced a hyperactivation of HPA axis along with an increased basal plasma CORT levels in young rats (Cai et al., 2010). This discrepancy may be related to differences in treatment used (duration of RA injections, doses) and nutritional status (vitamin A deficient rats vs control rats). Moreover, an interesting recent study, has proposed that excessive RA treatment could induce hyperactivation of HPA axis leading to hypersecretion of plasma CORT through an increased hypothalamic expression of RAR α and a deficient negative feedback at the level of hypothalamic GR expression (Hu et al., 2013). In our present study, elevated expression of RAR α would also be deleterious and associated with an alteration in HPA axis. We can propose that our more physiologic short-term RA treatment (150 μ g/kg) would lead to a normalization of HPA axis activity in middle-aged mice probably via a regulation of hippocampal RARs and GRs levels. However, the precise molecular mechanism by which RA and GCs signaling interacts, awaits future study. Thus, altogether these data suggested that vitamin A status would be an important nutritional factor to take into account in the modulation of the CORT at systemic levels which probably would

impact on hippocampal availability of CORT (Yau and Seckl, 2012).

DOES RETINOIC ACID TREATMENT ACT ON HIPPOCAMPAL PLASTICITY AND FUNCTIONS VIA GLUCOCORTICOIDS?

In the present study, we show that RA treatment has beneficial effects on hippocampal plasticity and functions at middle-age that probably via the modulation of intrahippocampal CORT levels. This hypothesis is also supported by the results of Tronche et al.'s (2010) study showing that the stress-induced hippocampal CORT levels in middle-aged mice were of greater magnitude as compared to young mice, and that a metyrapone (an inhibitor of CORT synthesis) injection before stress blocked both the stress-induced hippocampal CORT rise and associated memory retrieval impairment. GCs can promote behavioral adaptation, regulating (either enhancing or impairing) several memory processes (Joels, 2008). For example, stress can enhance the consolidation of spatial and emotional memories, but it can also impair their retrieval (de Quervain et al., 1998; Sandi and Pinelo-Nava, 2007). Thus, insofar as it has been shown that the effectiveness of learning throughout a continuum of stress and/or CORT levels generally follows an inverted U-shaped function (Salehi et al., 2010), we may hypothesize therefore that RA treatment could normalize stress levels in middle-aged mice during CSD task. Interestingly this hypothesis fits well with a previous study from our group having shown that the administration of diazepam inhibited the stress-induced increase of hippocampal CORT levels and in parallel, restored memory performance in the CSD task (Beracochea et al., 2011). Finally, a recent study has found a decrease in hippocampal PSD-95 protein levels after chronic CORT exposure (Cohen et al., 2011). Thus, PSD-95 seems to be a good plasticity-related RA and GCs target genes that could be involved, at least in part, in the positive effects of RA treatment on hippocampal functions.

CONCLUSION

The present study provides breakthrough evidence that RA treatment can decrease and delay the stress-induced intrahippocampal CORT rise in middle-aged mice. Moreover, correlations between vitamin A status evaluated by the hippocampal expression of retinoid receptors and CORT levels in the hippocampus have been evidenced. Interestingly, our data suggest that the improvement of memory and hippocampal plasticity in RA-treated mice could result from a decreased hippocampal CORT rise but future investigations are needed to establish a clear-cut causal link. Since vitamin A metabolism alterations occur during aging, our results are of prime importance and further substantiate the view that maintaining a normal vitamin A status in seniors would be crucial to prevent age-related cognitive impairments.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Dominique Panzeri, Nathalie Argenta, and Jennifer Huard for animal care. We also are grateful to Serge Alfos for technical contribution and to Dr Frances ASH (ashberac@free.fr) for language assistance. This work has been supported by the Région Aquitaine and CNRS.

REFERENCES

- Arvy, N., Hamiani, R., Richard, E., Moisan, M. P., and Pallet, V. (2013). Vitamin A regulates HPA axis status in LOU/C rats. *J. Endocrinol.* 219, 21–27. doi: 10.1530/JOE-13-0062
- Aubry, E. M., and Odermatt, A. (2009). Retinoic acid reduces glucocorticoid sensitivity in C2C12 myotubes by decreasing 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and glucocorticoid receptor activities. *Endocrinology* 150, 2700–2708. doi: 10.1210/en.2008-1618
- Azais-Braesco, V., Moriniere, C., Guesne, B., Partier, A., Bellenand, P., Baguelin, D., et al. (1995). Vitamin A status in the institutionalized elderly. Critical analysis of four evaluation criteria: dietary vitamin A intake, serum retinol, relative dose-response test (RDR) and impression cytology with transfer (ICT). *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 65, 151–161.
- Beique, J. C., Lin, D. T., Kang, M. G., Aizawa, H., Takamiya, K., and Haganir, R. L. (2006). Synapse-specific regulation of AMPA receptor function by PSD-95. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 19535–19540. doi: 10.1073/pnas.0608492103
- Beracochea, D., Boucard, A., Trocme-Thibierge, C., and Morain, P. (2008a). Improvement of contextual memory by S 24795 in aged mice: comparison with memantine. *Psychopharmacology (Berl.)* 196, 555–564. doi: 10.1007/s00213-007-0987-5
- Beracochea, D., Liscia, P., Tronche, C., Chauveau, F., Jouanin, J. C., and Pierard, C. (2008b). Stress modulation of the memory retrograde-enhancing effects of the awakening drug modafinil in mice. *Psychopharmacology (Berl.)* 196, 1–13. doi: 10.1007/s00213-007-0915-8
- Beracochea, D., Tronche, C., Coutan, M., Dorey, R., Chauveau, F., and Pierard, C. (2011). Interaction between diazepam and hippocampal corticosterone after acute stress: impact on memory in middle-aged mice. *Front. Behav. Neurosci.* 5:14. doi: 10.3389/fnbeh.2011.00014
- Bonnet, E., Touyarot, K., Alfos, S., Pallet, V., Higuieret, P., and Abrous, D. N. (2008). Retinoic acid restores adult hippocampal neurogenesis and reverses spatial memory deficit in vitamin A deprived rats. *PLoS ONE* 3:e3487. doi: 10.1371/journal.pone.0003487
- Born, J., Ditschuneit, I., Schreiber, M., Dodt, C., and Fehm, H. L. (1995). Effects of age and gender on pituitary–adrenocortical responsiveness in humans. *Eur. J. Endocrinol.* 132, 705–711. doi: 10.1530/eje.0.1320705
- Brossaud, J., Roumes, H., Moisan, M. P., Pallet, V., Redonnet, A., and Corcuff, J. B. (2013). Retinoids and glucocorticoids target common genes in hippocampal HT22 cells. *J. Neurochem.* 125, 518–531. doi: 10.1111/jnc.12192
- Cai, L., Yan, X. B., Chen, X. N., Meng, Q. Y., and Zhou, J. N. (2010). Chronic all-trans retinoic acid administration induced hyperactivity of HPA axis and behavioral changes in young rats. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 20, 839–847. doi: 10.1016/j.euroneuro.2010.06.019
- Cameron, H. A., and Gould, E. (1994). Adult neurogenesis is regulated by adrenal steroids in the dentate gyrus. *Neuroscience* 61, 203–209. doi: 10.1016/0306-4522(94)90224-0
- Carlisle, H. J., Fink, A. E., Grant, S. G., and O'Dell, T. J. (2008). Opposing effects of PSD-93 and PSD-95 on long-term potentiation and spike timing-dependent plasticity. *J. Physiol.* 586, 5885–5900. doi: 10.1113/jphysiol.2008.163469
- Celerier, A., Pierard, C., Rachbauer, D., Sarrieau, A., and Beracochea, D. (2004). Contextual and serial discriminations: a new learning paradigm to assess simultaneously the effects of acute stress on retrieval of flexible or stable information in mice. *Learn. Mem.* 11, 196–204. doi: 10.1101/lm.65604
- Chauveau, F., Pierard, C., Corio, M., Celerier, A., Christophe, T., Vouimba, R. M., et al. (2009a). Mediodorsal thalamic lesions block the stress-induced inversion of serial memory retrieval pattern in mice. *Behav. Brain Res.* 203, 270–278. doi: 10.1016/j.bbr.2009.05.014
- Chauveau, F., Pierard, C., Tronche, C., Coutan, M., Drouet, I., Liscia, P., et al. (2009b). The hippocampus and prefrontal cortex are differentially involved in serial memory retrieval in non-stress and stress conditions. *Neurobiol. Learn. Mem.* 91, 447–455. doi: 10.1016/j.nlm.2008.12.003
- Chauveau, F., Tronche, C., Pierard, C., Liscia, P., Drouet, I., Coutan, M., et al. (2010). Rapid stress-induced corticosterone rise in the hippocampus reverses serial memory retrieval pattern. *Hippocampus* 20, 196–207. doi: 10.1002/hipo.20605
- Chiang, M. Y., Misner, D., Kempermann, G., Schikorski, T., Giguere, V., Sucov, H. M., et al. (1998). An essential role for retinoid receptors RARbeta and RXRgamma in long-term potentiation and depression. *Neuron* 21, 1353–1361. doi: 10.1016/S0896-6273(00)80654-6
- Cocco, S., Diaz, G., Stancampiano, R., Diana, A., Carta, M., Curreli, R., et al. (2002). Vitamin A deficiency produces spatial learning and memory impairment in rats. *Neuroscience* 115, 475–482. doi: 10.1016/S0306-4522(02)00423-2
- Cohen, J. W., Louneva, N., Han, L. Y., Hodes, G. E., Wilson, R. S., Bennett, D. A., et al. (2011). Chronic corticosterone exposure alters postsynaptic protein levels of PSD-95, NR1, and synaptopodin in the mouse brain. *Synapse* 65, 763–770. doi: 10.1002/syn.20900
- Delint-Ramirez, I., Salcedo-Tello, P., and Bermudez-Rattoni, F. (2008). Spatial memory formation induces recruitment of NMDA receptor and PSD-95 to synaptic lipid rafts. *J. Neurochem.* 106, 1658–1668. doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05523.x
- de Quervain, D. J., Roozendaal, B., and McGaugh, J. L. (1998). Stress and glucocorticoids impair retrieval of long-term spatial memory. *Nature* 394, 787–790. doi: 10.1038/29542
- Drapeau, E., Mayo, W., Aourousseau, C., Le Moal, M., Piazza, P. V., and Abrous, D. N. (2003). Spatial memory performances of aged rats in the water maze predict levels of hippocampal neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 14385–14390. doi: 10.1073/pnas.2334169100
- Drapeau, E., Montaron, M. F., Aguerre, S., and Abrous, D. N. (2007). Learning-induced survival of new neurons depends on the cognitive status of aged rats. *J. Neurosci.* 27, 6037–6044. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1031-07.2007
- Dyall, S. C., Michael, G. J., and Michael-Titus, A. T. (2010). Omega-3 fatty acids reverse age-related decreases in nuclear receptors and increase neurogenesis in old rats. *J. Neurosci. Res.* 88, 2091–2102. doi: 10.1002/jnr.22390
- Enderlin, V., Pallet, V., Alfos, S., Dargelos, E., Jaffard, R., Garcin, H., et al. (1997). Age-related decreases in mRNA for brain nuclear receptors and target genes are reversed by retinoic acid treatment. *Neurosci. Lett.* 229, 125–129. doi: 10.1016/S0304-3940(97)00424-2
- Etchamendy, N., Enderlin, V., Marighetto, A., Pallet, V., Higuieret, P., and Jaffard, R. (2003). Vitamin A deficiency and relational memory deficit in adult mice: relationships with changes in brain retinoid signalling. *Behav. Brain Res.* 145, 37–49. doi: 10.1016/S0166-4328(03)00099-8
- Etchamendy, N., Enderlin, V., Marighetto, A., Vouimba, R. M., Pallet, V., Jaffard, R., et al. (2001). Alleviation of a selective age-related relational memory deficit in mice by pharmacologically induced normalization of brain retinoid signaling. *J. Neurosci.* 21, 6423–6429.
- Feart, C., Mingaud, F., Enderlin, V., Husson, M., Alfos, S., Higuieret, P., et al. (2005). Differential effect of retinoic acid and triiodothyronine on the age-related hypo-expression of neurogranin in rat. *Neurobiol. Aging* 26, 729–738. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2004.06.004
- Frick, K. M., Baxter, M. G., Markowska, A. L., Olton, D. S., and Price, D. L. (1995). Age-related spatial reference and working memory deficits assessed in the water maze. *Neurobiol. Aging* 16, 149–160. doi: 10.1016/0197-4580(94)00155-3
- Herman, J. P., Larson, B. R., Speert, D. B., and Seasholtz, A. F. (2001). Hypothalamo-pituitary–adrenocortical dysregulation in aging F344/Brown-Norway F1 hybrid rats. *Neurobiol. Aging* 22, 323–332. doi: 10.1016/S0197-4580(00)00242-6
- Holmes, M. C., Carter, R. N., Noble, J., Chitnis, S., Dutia, A., Paterson, J. M., et al. (2010). 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression is increased in the aged mouse hippocampus and parietal cortex and causes memory impairments. *J. Neurosci.* 30, 6916–6920. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0731-10.2010
- Holmes, M. C., Yau, J. L., Kotelevtsev, Y., Mullins, J. J., and Seckl, J. R. (2003). 11 Beta-hydroxysteroid dehydrogenases in the brain: two enzymes two roles. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1007, 357–366. doi: 10.1196/annals.1286.035
- Hu, P., Liu, J., Zhao, J., Qi, X. R., Qi, C. C., Lucassen, P. J., et al. (2013). All-trans retinoic acid-induced hypothalamus–pituitary–adrenal hyperactivity involves glucocorticoid receptor dysregulation. *Transl. Psychiatry* 3, e336. doi: 10.1038/tp.2013.98
- Joels, M. (2008). Functional actions of corticosteroids in the hippocampus. *Eur. J. Pharmacol.* 583, 312–321. doi: 10.1016/j.ejphar.2007.11.064
- Kaczorowski, C. C., and Disterhoft, J. F. (2009). Memory deficits are associated with impaired ability to modulate neuronal excitability in middle-aged mice. *Learn. Mem.* 16, 362–366. doi: 10.1101/lm.1365609
- Kadish, I., Thibault, O., Blalock, E. M., Chen, K. C., Gant, J. C., Porter, N. M., et al. (2009). Hippocampal and cognitive aging across the lifespan: a bioenergetic shift precedes and increased cholesterol trafficking parallels memory impairment. *J. Neurosci.* 29, 1805–1816. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4599-08.2009
- Lane, M. A., and Bailey, S. J. (2005). Role of retinoid signalling in the adult brain. *Prog. Neurobiol.* 75, 275–293. doi: 10.1016/j.pneurobio.2005.03.002

- Lupien, S. J., De Leon, M., De Santi, S., Convit, A., Tarshish, C., Nair, N. P., et al. (1998). Cortisol levels during human aging predict hippocampal atrophy and memory deficits. *Nat. Neurosci.* 1, 69–73. doi: 10.1038/271
- Marill, J., Idres, N., Capron, C. C., Nguyen, E., and Chabot, G. G. (2003). Retinoic acid metabolism and mechanism of action: a review. *Curr. Drug Metab.* 4, 1–10. doi: 10.2174/1389200033336900
- Markowska, A. L., and Breckler, S. J. (1999). Behavioral biomarkers of aging: illustration of a multivariate approach for detecting age-related behavioral changes. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 54, B549–B566. doi: 10.1093/gerona/54.12.B549
- McCaffery, P., Zhang, J., and Crandall, J. E. (2006). Retinoic acid signaling and function in the adult hippocampus. *J. Neurobiol.* 66, 780–791. doi: 10.1002/neu.20237
- Migaud, M., Charlesworth, P., Dempster, M., Webster, L. C., Watabe, A. M., Makhinson, M., et al. (1998). Enhanced long-term potentiation and impaired learning in mice with mutant postsynaptic density-95 protein. *Nature* 396, 433–439. doi: 10.1038/24790
- Mingaud, F., Mormede, C., Etchamendy, N., Mons, N., Niedergang, B., Wietrzyk, M., et al. (2008). Retinoid hyposignaling contributes to aging-related decline in hippocampal function in short-term/working memory organization and long-term declarative memory encoding in mice. *J. Neurosci.* 28, 279–291. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4065-07.2008
- Mizoguchi, K., Ikeda, R., Shoji, H., Tanaka, Y., Maruyama, W., and Tabira, T. (2009). Aging attenuates glucocorticoid negative feedback in rat brain. *Neuroscience* 159, 259–270. doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.12.020
- Nyffeler, M., Zhang, W. N., Feldon, J., and Knuesel, I. (2007). Differential expression of PSD proteins in age-related spatial learning impairments. *Neurobiol. Aging* 28, 143–155. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2005.11.003
- Oitzl, M. S., and de Kloet, E. R. (1992). Selective corticosteroid antagonists modulate specific aspects of spatial orientation learning. *Behav. Neurosci.* 106, 62–71. doi: 10.1037/0735-7044.106.1.62
- Olson, C. R., and Mello, C. V. (2010). Significance of vitamin A to brain function, behavior and learning. *Mol. Nutr. Food Res.* 54, 489–495. doi: 10.1002/mnfr.200900246
- Paez-Pereda, M., Kovalovsky, D., Hopfner, U., Theodoropoulou, M., Pagotto, U., Uhl, E., et al. (2001). Retinoic acid prevents experimental Cushing syndrome. *J. Clin. Invest.* 108, 1123–1131. doi: 10.1172/JCI11098
- Paxinos, G., and Franklin, K. B. J. (2001). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, 2nd Edn. San Diego: Academic Press.
- Penniston, K. L., and Tanumihardjo, S. A. (2006). The acute and chronic toxic effects of vitamin A. *Am. J. Clin. Nutr.* 83, 191–201.
- Pepeu, G. (2004). Mild cognitive impairment: animal models. *Dialogues Clin. Neurosci.* 6, 369–377.
- Pierard, C., Tronche, C., Liscia, P., Chauveau, F., and Beracochea, D. (2009). Combined effects of acute stress and amphetamine on serial memory retrieval pattern in mice. *Psychopharmacology (Berl.)* 203, 463–473. doi: 10.1007/s00213-008-1391-5
- Sakamuri, V. P., Ananthmakula, P., Veettil, G. N., and Ayyalasomayajula, V. (2011). Vitamin A decreases pre-receptor amplification of glucocorticoids in obesity: study on the effect of vitamin A on 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity in liver and visceral fat of WNIN/Ob obese rats. *Nutr. J.* 10, 70. doi: 10.1186/1475-2891-10-70
- Salehi, B., Cordero, M. I., and Sandi, C. (2010). Learning under stress: the inverted-U-shape function revisited. *Learn. Mem.* 17, 522–530. doi: 10.1101/lm.1914110
- Sandi, C., and Pinelo-Nava, M. T. (2007). Stress and memory: behavioral effects and neurobiological mechanisms. *Neural Plast.* 2007, 78970. doi: 10.1155/2007/78970
- Seckl, J. R. (1997). 11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase in the brain: a novel regulator of glucocorticoid action? *Front. Neuroendocrinol.* 18, 49–99. doi: 10.1006/frne.1996.0143
- Touyarot, K., Bonhomme, D., Roux, P., Alfoss, S., Lafenetre, P., Richard, E., et al. (2013). A mid-life vitamin A supplementation prevents age-related spatial memory deficits and hippocampal neurogenesis alterations through CRABP-I. *PLoS ONE* 8:e72101. doi: 10.1371/journal.pone.0072101
- Tronche, C., Pierard, C., Coutan, M., Chauveau, F., Liscia, P., and Beracochea, D. (2010). Increased stress-induced intra-hippocampus corticosterone rise associated with memory impairments in middle-aged mice. *Neurobiol. Learn. Mem.* 93, 343–351. doi: 10.1016/j.nlm.2009.11.009
- VanGuilder, H. D., Farley, J. A., Yan, H., Van Kirk, C. A., Mitschelen, M., Sonntag, W. E., et al. (2011). Hippocampal dysregulation of synaptic plasticity-associated proteins with age-related cognitive decline. *Neurobiol. Dis.* 43, 201–212. doi: 10.1016/j.nbd.2011.03.012
- Vickers, C. A., Stephens, B., Bowen, J., Arbuthnott, G. W., Grant, S. G., and Ingham, C. A. (2006). Neurone specific regulation of dendritic spines in vivo by post synaptic density 95 protein (PSD-95). *Brain Res.* 1090, 89–98. doi: 10.1016/j.brainres.2006.03.075
- Wietrzyk, M., Meziane, H., Sutter, A., Ghyselinck, N., Chapman, P. F., Chambon, P., et al. (2005). Working memory deficits in retinoid X receptor gamma-deficient mice. *Learn. Mem.* 12, 318–326. doi: 10.1101/lm.89805
- Yau, J. L., Noble, J., Kenyon, C. J., Hibberd, C., Kotelevtsev, Y., Mullins, J. J., et al. (2001). Lack of tissue glucocorticoid reactivation in 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 knockout mice ameliorates age-related learning impairments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 4716–4721. doi: 10.1073/pnas.071562698
- Yau, J. L., and Seckl, J. R. (2012). Local amplification of glucocorticoids in the aging brain and impaired spatial memory. *Front. Aging Neurosci.* 4:24. doi: 10.3389/fnagi.2012.00024

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 07 November 2013; accepted: 10 January 2014; published online: 07 February 2014.

Citation: Bonhomme D, Pallet V, Dominguez G, Servant L, Henkous N, Lafenêtre P, Higuieret P, Béracochea D and Touyarot K (2014) Retinoic acid modulates intrahippocampal levels of corticosterone in middle-aged mice: consequences on hippocampal plasticity and contextual memory. *Front. Aging Neurosci.* 6:6. doi: 10.3389/fnagi.2014.00006

This article was submitted to the journal *Frontiers in Aging Neuroscience*.

Copyright © 2014 Bonhomme, Pallet, Dominguez, Servant, Henkous, Lafenêtre, Higuieret, Béracochea and Touyarot. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

PARTIE III

EFFET DE L'APPORT ALIMENTAIRE EN VITAMINE A SUR LA SYNTHÈSE D'ACIDE RÉTINOÏQUE DANS LES STRUCTURES CÉRÉBRALES : MISE AU POINT DU DOSAGE DE L'ACIDE RÉTINOÏQUE DANS LES TISSUS BIOLOGIQUES

I. Introduction

La découverte du rôle clé joué par la vitamine A dans les processus neurobiologiques et cognitifs (Maden, 2007) a ouvert une voie de recherche très innovante et prometteuse dans la perspective de la définition d'une nutrition préventive ciblée sur le maintien des capacités mnésiques des personnes âgées. Chez ces personnes, une forte perturbation du métabolisme de la vitamine A apparaît au cours du vieillissement. Elle peut conduire à des concentrations élevées de cette vitamine dans le foie (van der Loo et al., 2004) alors que dans le même temps la capacité de l'organisme à mobiliser les réserves hépatiques de vitamine A pour la métaboliser efficacement en acide rétinoïque (AR) semble fortement affectée chez l'homme âgé (Azais-Braesco et al., 1995). Il en résulte une diminution du niveau cellulaire d'AR, qui, ainsi que cela a été montré chez l'animal âgé, conduit à une baisse d'activité de la voie de signalisation des rétinoïdes dans les tissus cibles, dont le cerveau (Enderlin et al., 1997a; Pallet et al., 1997). Cela se traduit par une hypo-expression des récepteurs nucléaires de l'acide tout-*trans* rétinoïque et de l'acide 9-*cis* rétinoïque (récepteurs RAR et RXR respectivement), qui sont des facteurs de transcription inductibles par leurs ligands (Chambon, 1996) et qui régulent l'expression de très nombreux gènes dans le cerveau.

La contribution originale de notre équipe à ces recherches a été la découverte, en collaboration avec l'Equipe de Neurosciences Cognitives de Robert Jaffard (Etchamendy et al., 2001): (i) du rôle clé de la baisse de l'activité cellulaire de l'acide rétinoïque dans l'étiologie de déficits mnésiques spécifiques associés au vieillissement, (ii) de la restauration de ces capacités mnésiques par un traitement par l'acide rétinoïque (AR), (iii) de la démonstration de l'efficacité d'une supplémentation nutritionnelle en vitamine A chez les animaux adultes qui permet à la fois le maintien de l'activité de sa voie de signalisation, et prévient l'apparition de troubles mnésiques spécifiques liés au vieillissement (Mingaud et al., 2008; Touyarot et al., 2013). Il est aujourd'hui bien admis qu'il existe une relation étroite entre le niveau d'activité cérébrale de la voie d'action des rétinoïdes, l'expression de gènes

cibles impliqués dans certains processus de plasticité (Husson et al., 2004), et les performances mnésiques (Mingaud et al., 2008).

Notre équipe a également montré, en collaboration avec Jean-François Dartigues au Centre de Recherche INSERM U897, spécialiste du vieillissement mnésique, que cette atteinte du statut en rétinoïdes, conduisant à une hypo-expression des récepteurs nucléaires de l'AR dans les tissus cibles, intervient également chez l'Homme âgé (Feart et al., 2005b).

Actuellement le niveau d'activité de la voie de signalisation de l'acide rétinoïque n'est évalué que de manière indirecte, par mesure de l'expression de ses récepteurs nucléaires. Mais il apparaît que le dosage de l'AR dans les tissus cibles permettrait de valider incontestablement son implication directe dans le maintien des processus neurobiologiques qui déterminent les fonctions mnésiques. D'autre part, ce dosage permettrait également de valider l'hypothèse selon laquelle l'âge conduit à une diminution de la synthèse d'AR à partir de la vitamine A et donc à une diminution de sa biodisponibilité, en particulier dans les structures cérébrales importantes pour la mémoire. D'autre part, notre équipe développe actuellement un projet de recherche clinique pour aborder la preuve de concept de l'efficacité d'une supplémentation nutritionnelle en vitamine A sur le maintien des capacités mnésiques de sujets âgés (projet Nutrimémo). Le dosage de l'AR dans le sérum de ces sujets devrait nous permettre, dans un second temps, de valider son utilisation comme biomarqueur de vulnérabilité au déclin mnésique.

A l'heure actuelle, seule une équipe américaine effectue ce dosage (Kane and Napoli, 2010), c'est dire si cette compétence est rare, et il est crucial pour l'avancée des recherches du laboratoire de pouvoir maîtriser cette technique. Or, le dosage de l'AR à partir d'échantillons biologiques est une technique très délicate dans la mesure où celui-ci est une molécule très hautement oxydable et n'est présent qu'à de très faible concentration (de l'ordre du nM). La technique à mettre en œuvre doit par conséquent allier sensibilité et sélectivité, qualités réunies par la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (CL-SM/SM), utilisant le mode d'analyse Multiple Reaction Monitoring (MRM) (Xuereb et al., 2011). La mise au point de cette méthode de dosage a fait l'objet d'une collaboration avec l'équipe de JM Schmitter (CBMN, UMR 5248).

L'objectif de cette étude est donc double :

- Mettre au point le dosage de l'acide rétinoïque dans les échantillons biologiques (structures cérébrales, sérum).
- Etudier chez le rat l'effet du niveau de l'apport alimentaire en vitamine A (déficit ou supplémentation) sur la concentration d'acide rétinoïque dans les différentes structures cérébrales et le sérum.

II. Matériels et Méthodes

II.1. Animaux et sacrifices

Des rats mâles Wistar (Janvier) âgés de 3 mois (n=20) ont reçu un régime alimentaire contrôle (5 UI rétinol/g ; INRA, Jouy-en-Josas, France) jusqu'à leur sacrifice.

Après avoir été anesthésiés par l'isoflurane, les rats ont été décapités. Les structures cérébrales (hippocampe, hypothalamus, striatum et cortex préfrontal) ont été rapidement prélevées pour chaque hémisphère, puis immédiatement congelées dans de l'azote liquide et conservées à -80°C jusqu'au moment des analyses. Par ailleurs, du sang a également été récupéré lors du sacrifice. Il a ensuite été centrifugé (3000tours/min pendant 15min) et le sérum a été prélevé avant d'être rapidement congelé puis conservé à -80°C jusqu'aux analyses.

Ces opérations ont été réalisées en lumière rouge afin de limiter au maximum le risque de dégradation de l'acide rétinoïque.

II.2. Principe de la méthode

Le dosage comporte 3 étapes :

- Extraction de l'AR de la matrice (tissus cérébraux ou plasma).
- Séparation par chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP).
- Détection et quantification par spectrométrie de masse en tandem (SM/SM) en mode MRM (Multiple Reaction Monitoring).

II.2.1. Principe de l'extraction de l'AR

Le principe de l'extraction de l'AR repose sur une double extraction acide/base comme décrit par Kane and Napoli, (2010).

II.2.2. Principe de la chromatographie en phase liquide à haute performance

Cette technique de chromatographie permet la séparation ou la purification d'un ou de plusieurs composés d'un mélange en vue de leur identification et de leur quantification (*Figure 30*).

Le système de CLHP se compose de 2 phases : une phase mobile et une phase stationnaire.

- *La phase mobile* est composée d'un mélange de solvant dont les concentrations peuvent évoluer (gradient d'élution) ou non (isocratique) au cours du temps. Cette phase parcourt le système poussée par une pompe.
- *La phase stationnaire* est située dans une colonne de chromatographie et peut se présenter sous différentes formes (phase normale ou phase inverse) en fonction de la colonne utilisée. Ainsi, une phase normale (NP) sera constituée de gel de silice (polaire) et pour l'élution il faudra utiliser un éluant apolaire. Dans le cas contraire, une phase inverse (RP) est majoritairement composée de silices greffées par des chaînes linéaires de 8 ou 18 atomes de carbone (C₈ et C₁₈) ce qui en fait une phase apolaire qui devra alors être élue avec un éluant polaire (ACN, MeOH, H₂O). La phase inverse possède l'avantage de ne pas se détériorer au cours du temps et ainsi de garder une qualité de séparation constante au cours du temps.

L'échantillon à séparer est injecté dans le système par une boucle d'injection dont le volume peut varier en fonction des besoins de l'utilisateur. Il se mélange alors dans la phase mobile, avant d'interagir avec la phase stationnaire. Les différents composés de l'échantillon seront ensuite élués progressivement grâce aux gradients de concentrations différentiels de phase mobile au cours du temps.

En sortie de colonne, les différentes molécules peuvent ensuite être quantifiées avec un détecteur UV ou un réfractomètre ou encore par spectrométrie de masse.

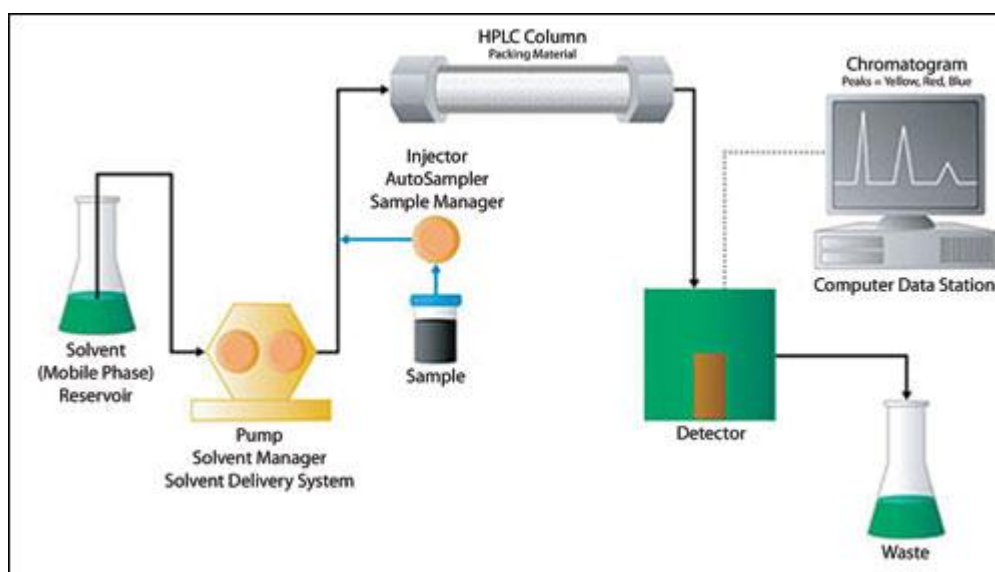


Figure 30 : Principe de la chromatographie en phase liquide à haute performance.

II.2.3. Principe de la spectrométrie de masse en tandem (SM/SM)

Le principe de la spectrométrie de masse (SM) repose sur la séparation en phase gazeuse de molécules chargées en fonction de leur rapport masse/charge (m/z).

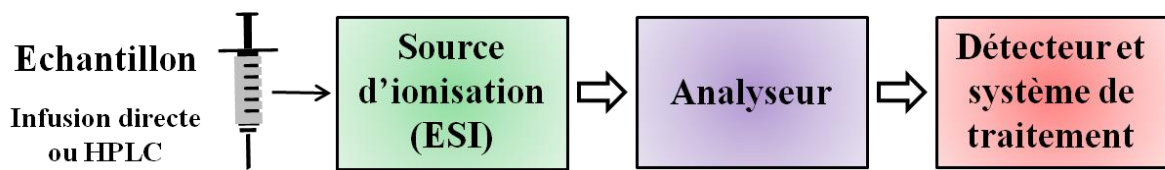
Le spectromètre de masse se compose donc de quatre parties (Figure 31 A) :

- *Un système d'introduction de l'échantillon.* Il peut être introduit directement (Infusion directe sous forme liquide) ou indirectement dans la source (associé à une méthode séparative type CLHP). Dans le cadre de notre étude, les 2 méthodes ont été utilisées.
- *Une source d'ionisation.* Elle consiste à vaporiser les molécules et à les ioniser. Une source d'ionisation peut être utilisée soit en mode positif pour étudier les ions positifs, soit en mode négatif pour étudier les ions négatifs. Plusieurs types de sources existent dans notre cas, nous avons utilisé l'électronébulisation également appelé électrospray (ESI) (Figure 31 B).
- *Un analyseur.* Il va permettre la séparation des ions formés par la source d'ionisation en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). Il existe plusieurs types d'analyseurs et plusieurs modes d'analyse. Dans cas d'une analyse par spectrométrie de masse en tandem SM/SM en mode MRM (Multiple Reaction Monitoring), les ions sont séparés successivement par 2 analyseurs. Ainsi, un premier analyseur (Q1 ou MS1) sépare les ions parents, une cellule de collision (Q2) permet de fragmenter les ions parents en ions fils, et un second analyseur sépare les ions fils (Q3 ou MS2). Dans notre étude, il s'agissait d'analyseurs basses

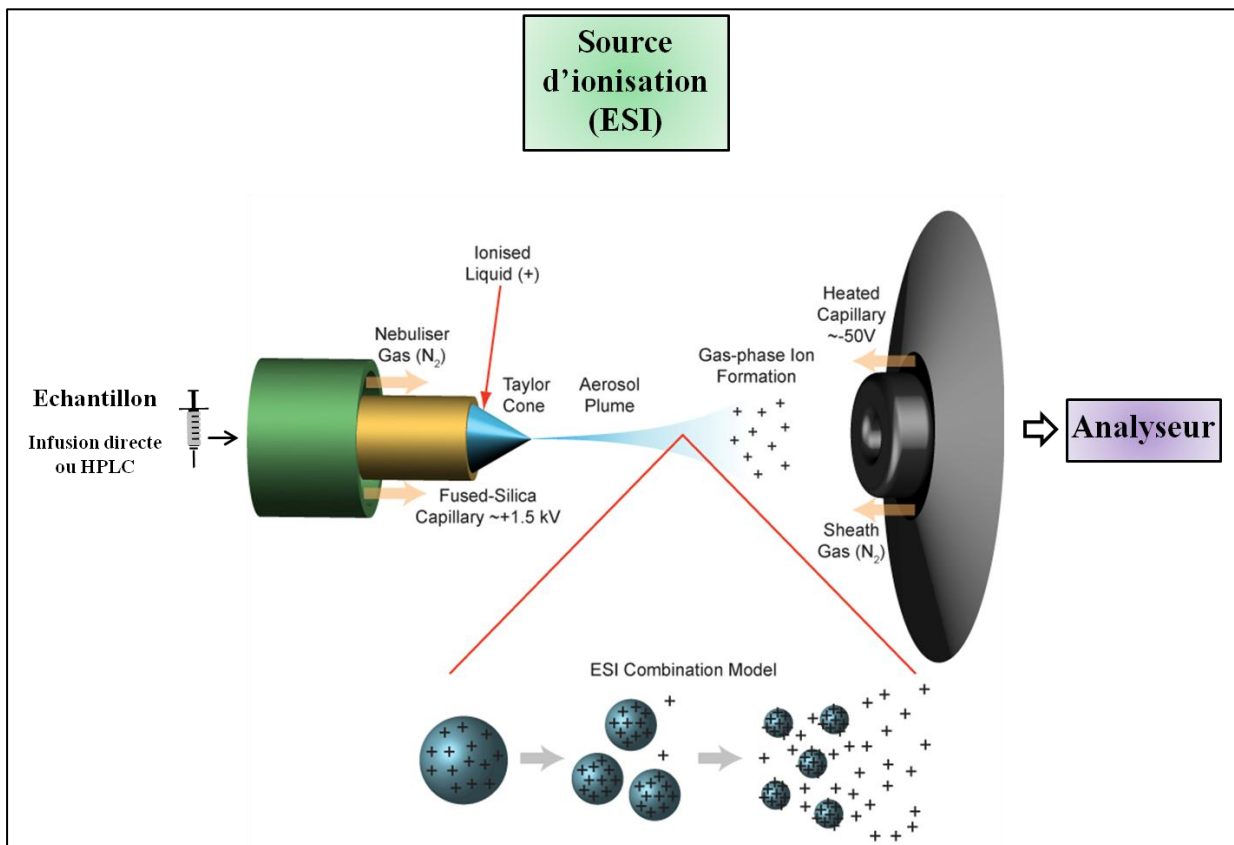
résolutions : un quadripôle ou quadrupôle (Q) couplé a un piège à ions 3D (IT) soit un Q-IT (Figure 31 C) nous permettant ainsi de fragmenter les ions et d'analyser les fragments directement. En outre, les deux analyseurs étant fixés à des tensions constantes, la sensibilité de détection est améliorée par rapport à d'autres modes de balayage, faisant de la MRM un mode de choix pour la quantification.

- *Un détecteur et système de traitement.* Le détecteur transforme les ions en signal électrique. Plus les ions sont nombreux, plus le courant est important. De plus, le détecteur amplifie le signal obtenu pour qu'il puisse être traité informatiquement.

A



B



C

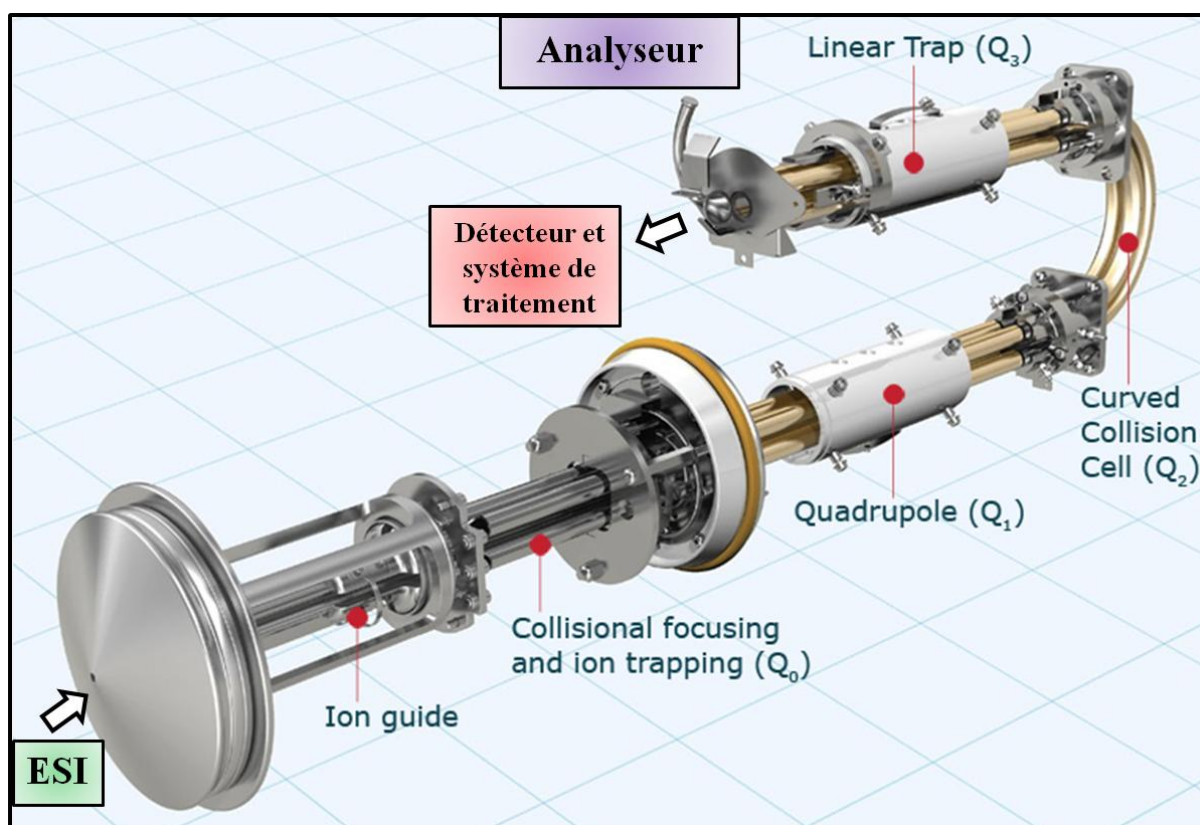


Figure 31 : Principe de la spectrométrie de masse. A. Configuration générale du spectromètre de masse utilisé. B. Principe de l'ionisation électrospray. C. Configuration de l'analyseur Q-IT.

III. Résultats : Mise au point

III.1. Mise au point et optimisation des paramètres en SM/SM

La mise au point et l'optimisation des paramètres en SM/SM ont été réalisées sur un spectromètre de masse ESI-QTRAP 5500 (AB Sciex). Elles ont été effectuées à partir de plusieurs isomères d'acide rétinoïque issus de solutions commerciales, mais également à partir d'une solution d'acitretin, produit qui a été utilisé comme standard interne dans les analyses de CL-SM/SM.

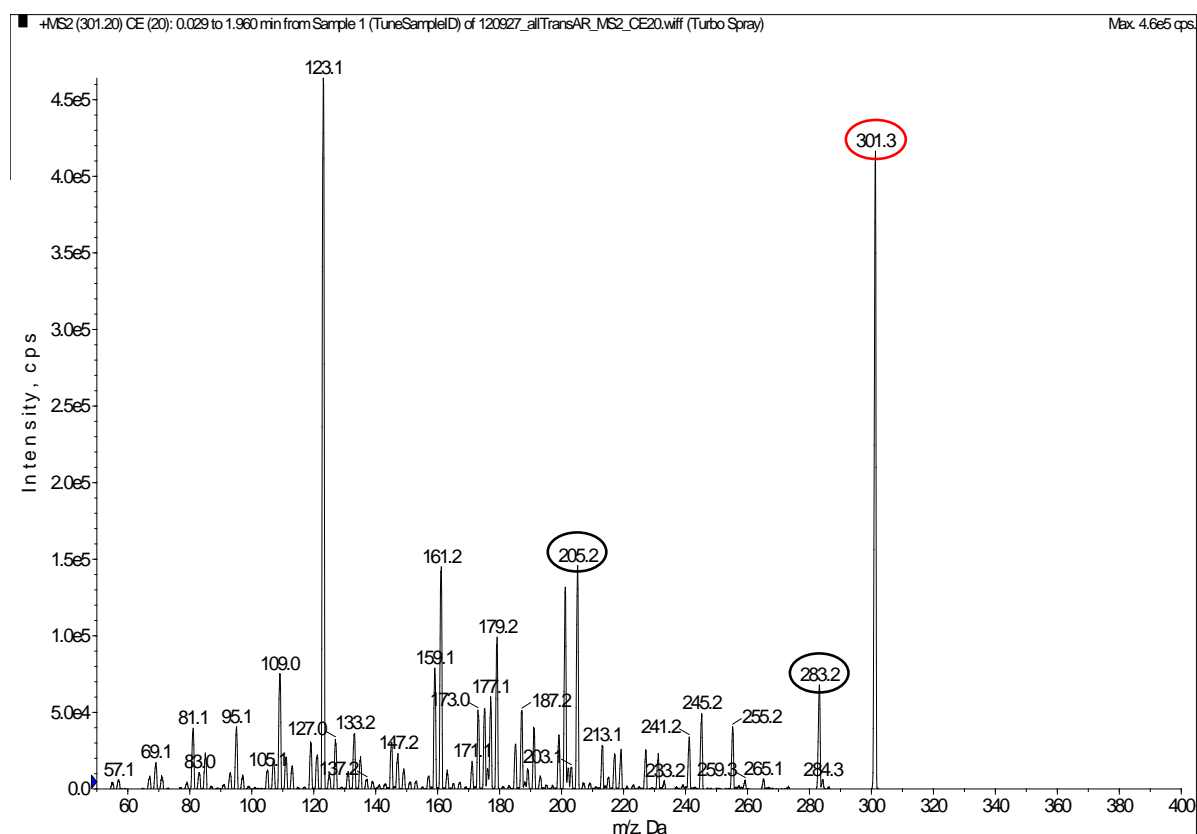
- Acide rétinoïque All-*trans* (Sigma, France)
- Acide rétinoïque 9-*cis* (Sigma, France)

- Acide rétinoïque 13-*cis* (Sigma, France)
- Acitretin (Sigma, France)

Voici les paramètres retenus : optimisation en mode positif pour All-*trans* AR, 9-*cis* AR, 13-*cis* AR, Acitretin : Tension appliquée sur l'aiguille : 5500V ; Gaz rideau : 20 (unité arbitraire) ; Vitesse de balayage : 10Da/s.

Par ailleurs, l'infusion directe nous a permis de déterminer les meilleures transitions de phases, c'est-à-dire les différents fragments d'ions fils détectés sur la seconde masse après le fractionnement dans la cellule de collision en utilisant différentes valeurs pour les énergies de collision (CE=20 et CE=30) (exemple avec l'AR all-*trans* Figure 32).

A



B

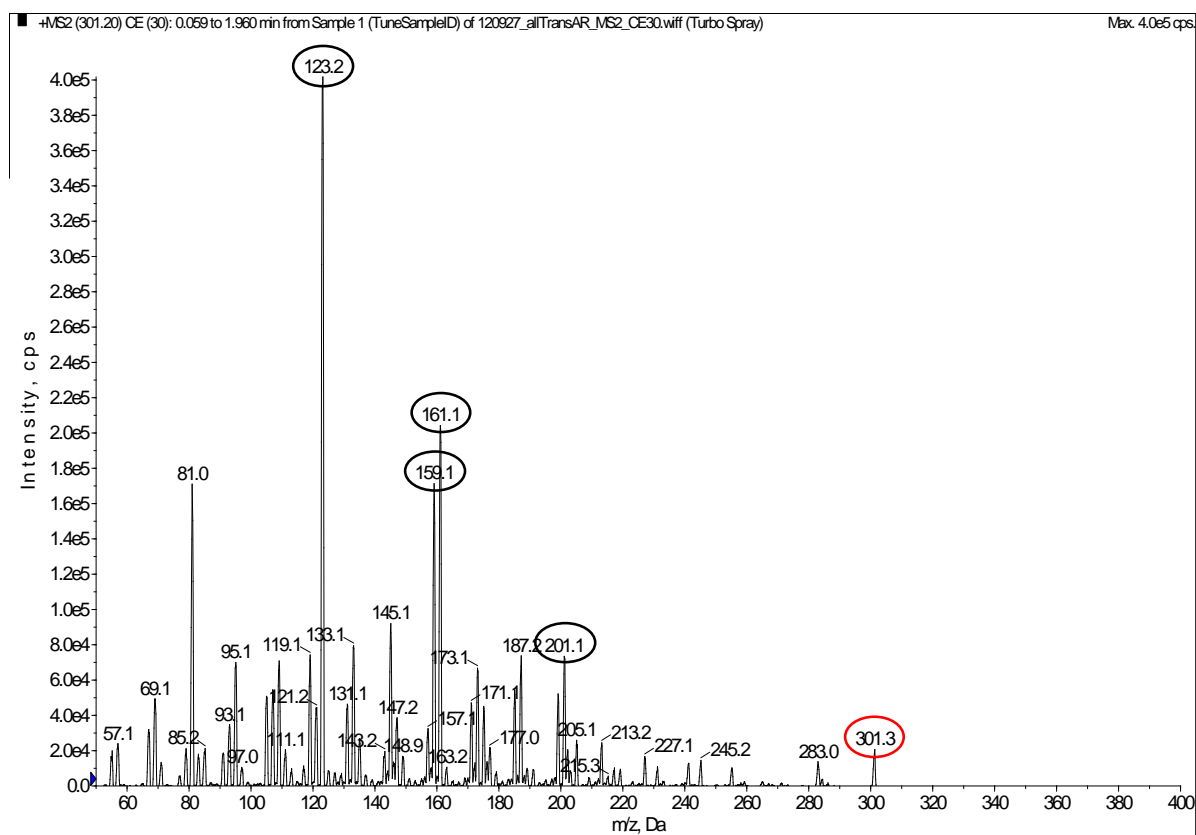


Figure 32 : Spectres de masse obtenus après infusion directe d'AR all-*trans*. A. Spectre de masse obtenu après fragmentation avec une énergie de collision de 20. B. Spectre de masse obtenu après fragmentation avec une énergie de collision de 30. Entouré en rouge : l'ion parent et en noir : les ions fils d'intérêt. AR all-*trans* à 1 μ M dans de l'acétonitrile (ACN).

Les transitions de phases que nous avons retenues pour les isomères d'acide rétinoïque sont les suivantes (entourées en bleu sur la figure): 123,2Da ; 159,1Da ; 161,1Da ; 205,2Da ; 283,2Da.

Les transitions de phases que nous avons retenues pour l'acitretin sont les suivantes (entourées en bleu sur la figure): 131Da ; 151,1Da ; 159,1Da ; 177,2 ; 201,1Da ; 267,2Da.

III.2. Mise au point et optimisation des paramètres en CLHP

Les paramètres d'optimisation de la méthode ont été mis au point sur une CLHP Ultimate 3000 (Thermo) couplée au spectromètre de masse. La colonne utilisée était la suivante : colonne Ascentis RP amide 150x1 mm, 3 μ m (Supelco).

La méthode retenue était la suivante méthode en CL-SM/SM : La méthode retenue est : 120928_LC_MRM_RPamide3.dam (Figure 33) :

- Solvant A : H₂O + 0.1% Acide Formique,
- Solvant B : ACN + 0.1% Acide Formique.
- Débit : 50 μ l/min.
- Gradient : 0min, 70%B ; 3min, 70%B ; 15min, 95%B ; 20min, 95%B ; 21min, 70%B ; 41min, 70%B.
- Volume de l'échantillon injecté : de 3 à 10 μ L.

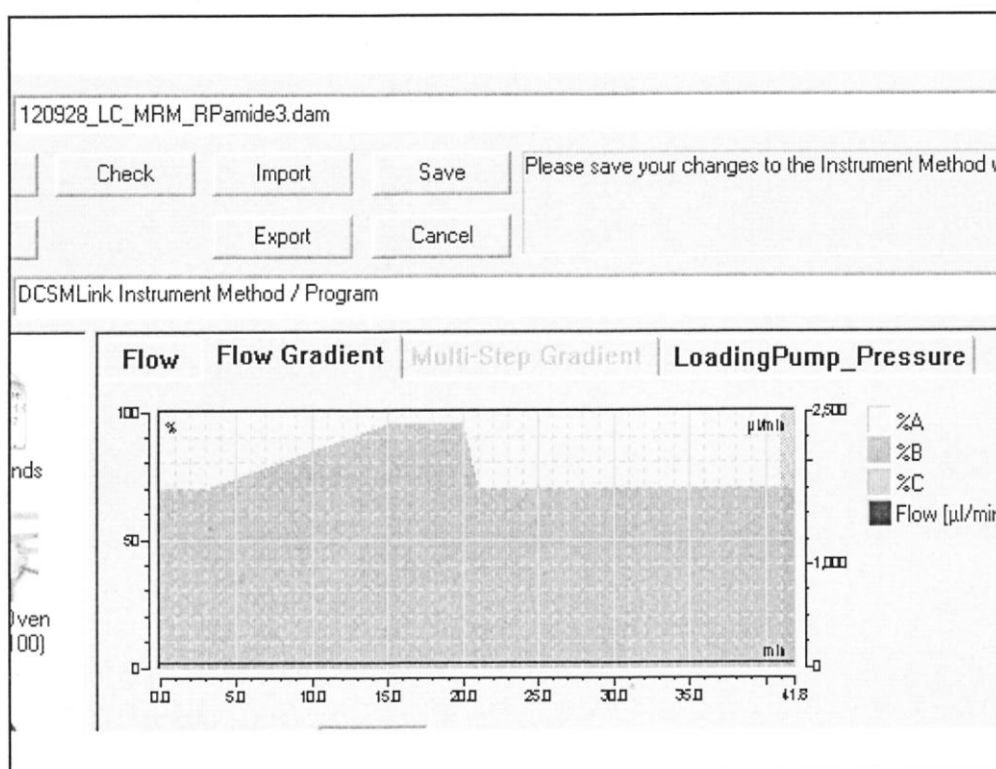
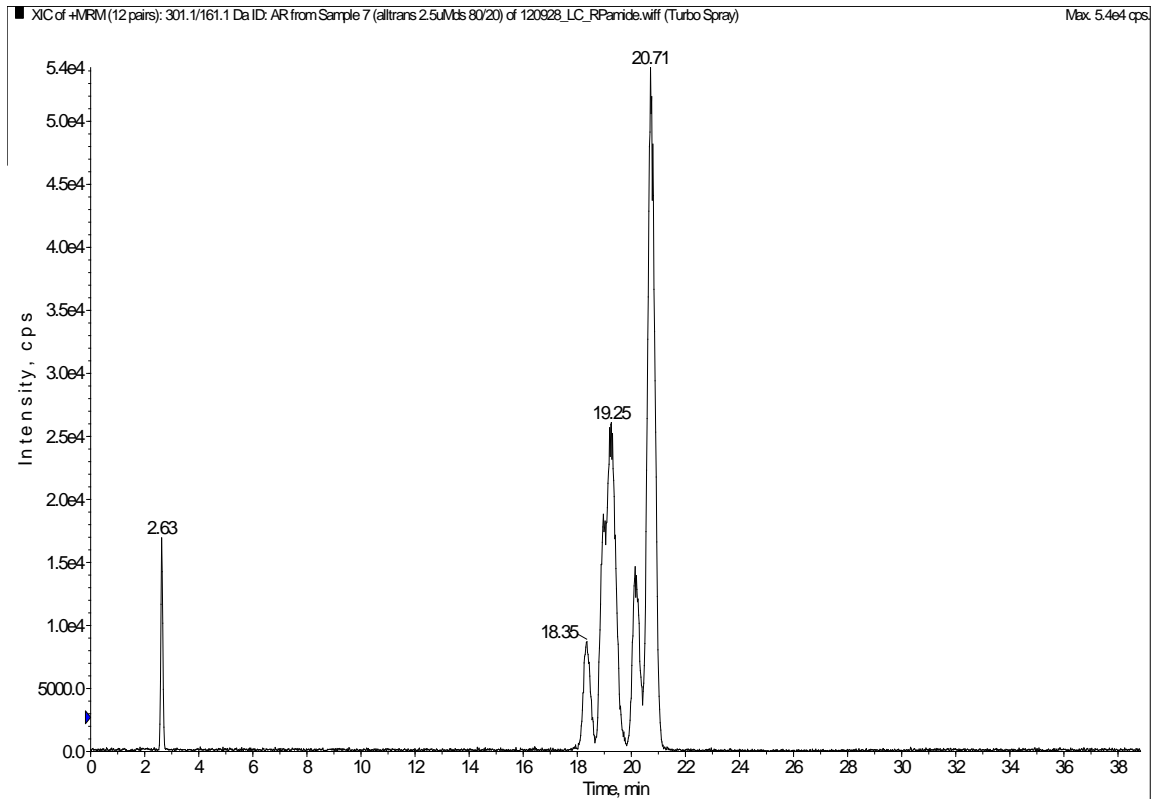


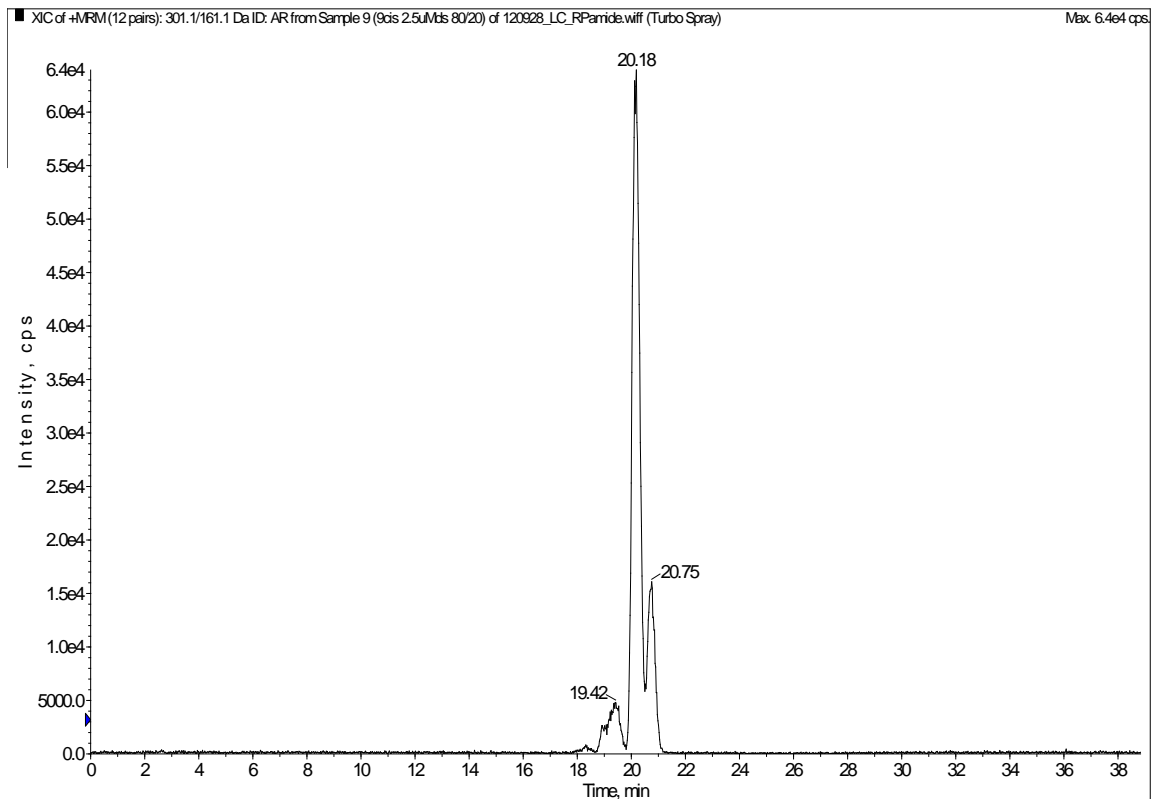
Figure 33 : Méthode en CL-SM/SM.

Les échantillons issus des solutions commerciales ont ensuite été analysés individuellement en utilisant cette méthode (Figure 34).

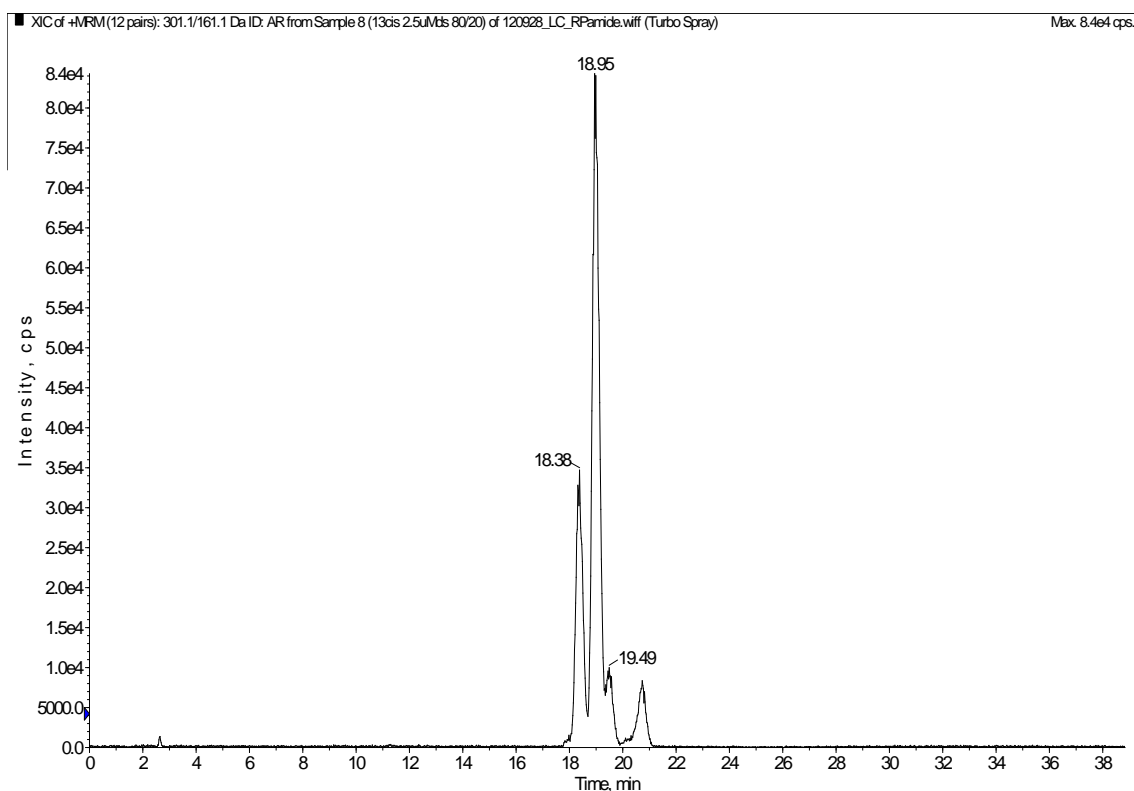
A



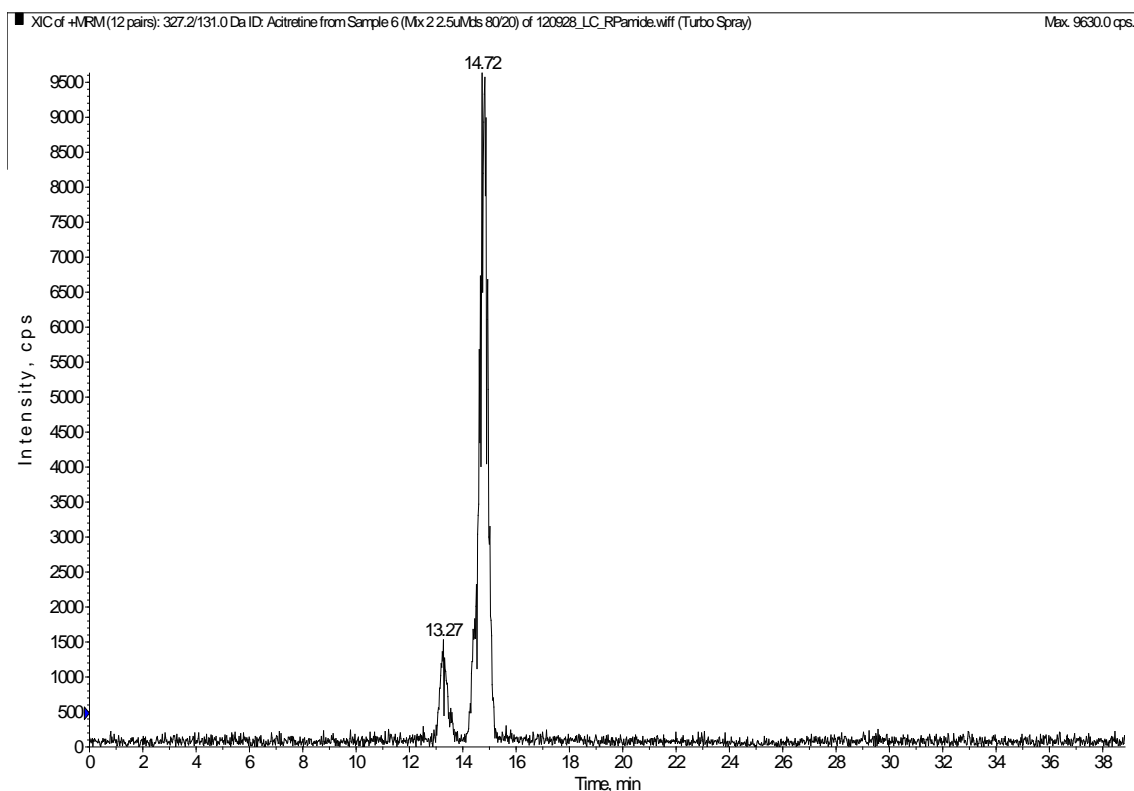
B



C



D



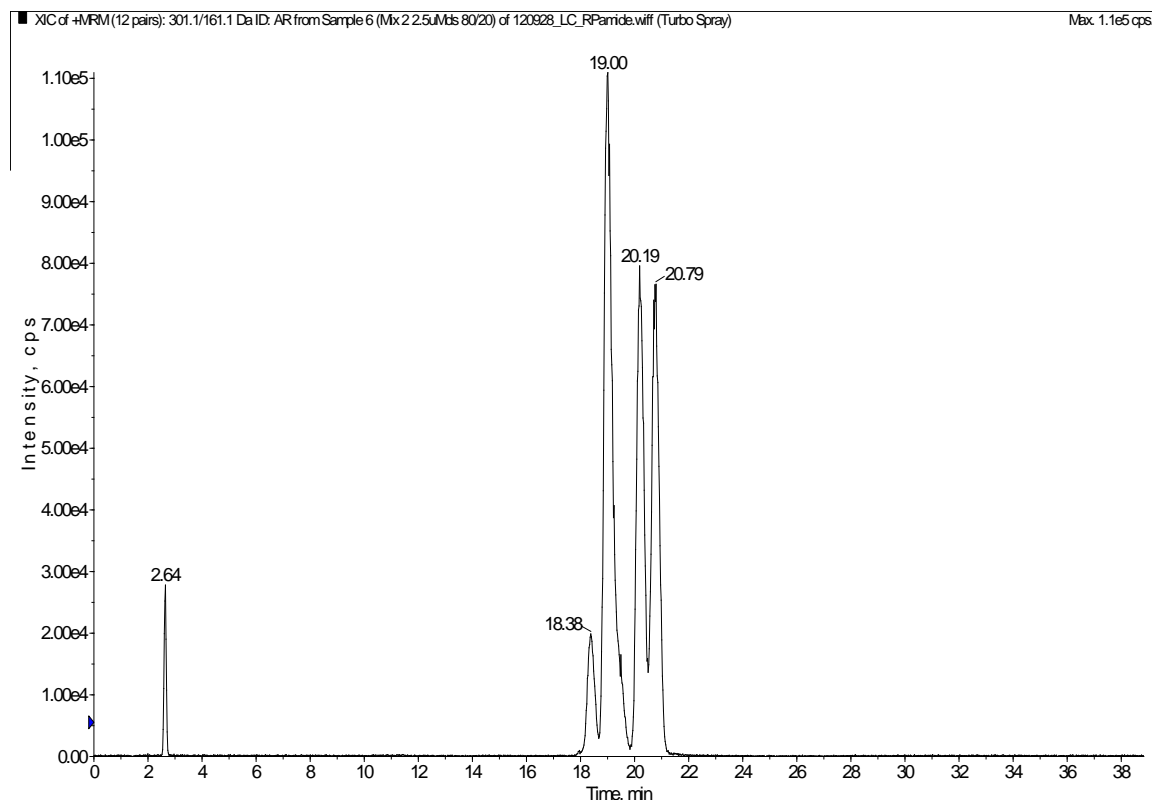
E

Figure 34 : Spectres de masse des échantillons issus de solutions commerciales. A. Spectre de masse de l'AR *all-trans*. B. Spectre de masse de l'AR *9-cis*. C. Spectre de masse de l'AR *13-cis*. D. Spectre de masse de l'acitretin. E Spectre de masse du mix AR *all-trans*, *9-cis*, *13-cis* et acitretin. Toutes les solutions sont préparées à 2,5 μ M dans de l'ACN. Les transitions de phase présentées sont celles de plus forte intensité (123,2Da pour l'acitretin, 161,1Da pour les autres échantillons).

Les temps de rétention retenus sont les suivants : AR *all-trans* : 20,71min ; AR *9-cis* : 20,18min ; AR *13-cis* : 18,95min ; Acitretin : 14,72min.

III.3. Mise au point de l'extraction de l'AR tissulaire

Une fois les paramètres de CLHP et SM/SM déterminés, nous avons mis au point l'extraction. Après plusieurs essais infructueux avec des cartouches d'extraction Strata-X

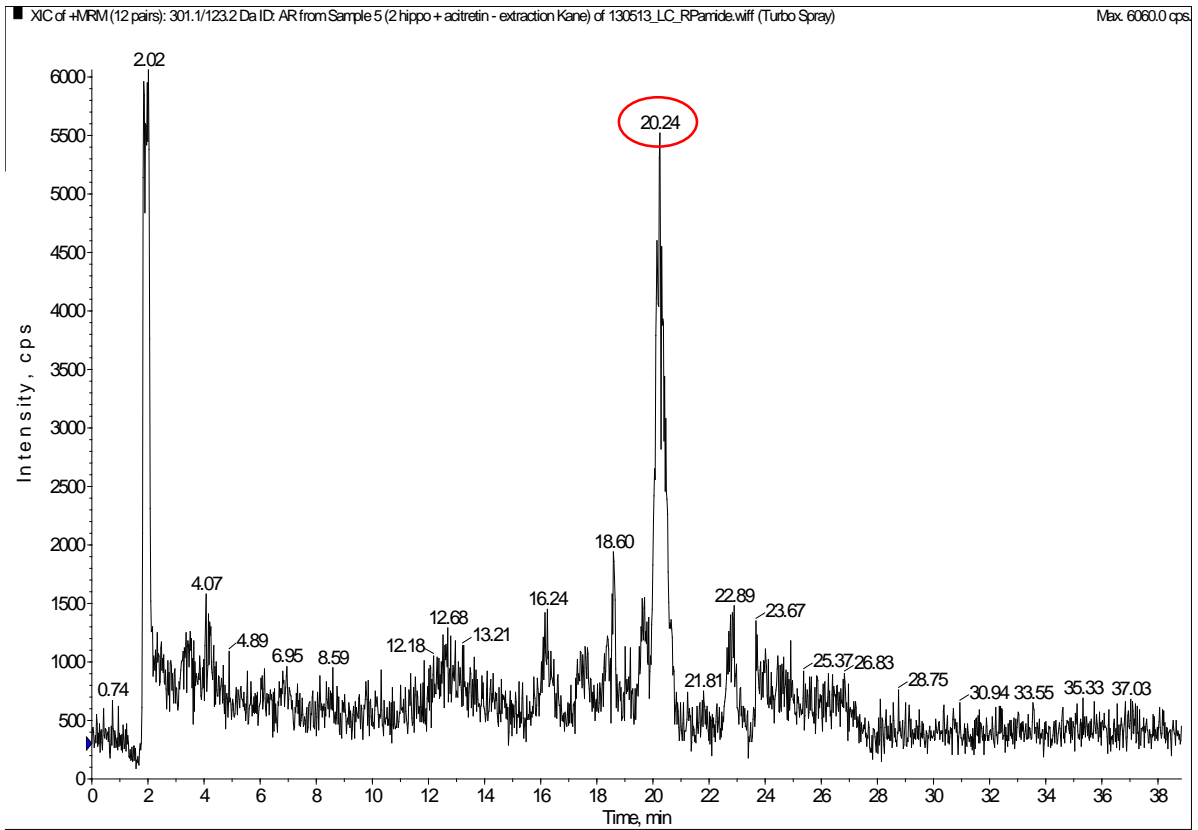
33 μ m Polymeric Reversed Phase 30mg/1mL (Phenomenex), nous avons finalement utilisé le protocole d'extraction acide/base suivant (Kane and Napoli, 2010) :

- Broyage de la structure dans 1 mL de NaCl 0,9%.
- Prélever avec une pipette en verre la totalité du volume et le transférer dans un tube à essai en verre de 15mL.
- Ajouter 10 μ L d'acitretin à 500 μ M (Standard Interne).
- Ajouter 2mL de la solution à 0,025 KOH, vortexer.
- Ajouter 1mL d'acétonitrile, vortexer.
- Ajouter 8mL d'hexane, vortexer.
- Centrifuger à 1000G pendant 3min.
- Enlever ou récupérer la phase supérieure (hexane) contenant le rétinol et les rétinyls esters. Les évaporer sous azote pour les doser.
- Ajouter 120 μ L d'HCl 4M, vortexer.
- Ajouter 8mL d'hexane, vortexer.
- Centrifuger à 1000G pendant 3min.
- Récupérer la phase supérieure (hexane) contenant l'AR.
- Evaporer sous azote.
- Resuspendre dans 60 μ L d'acétonitrile, vortexer
- Transférer dans des tubes à CLHP.

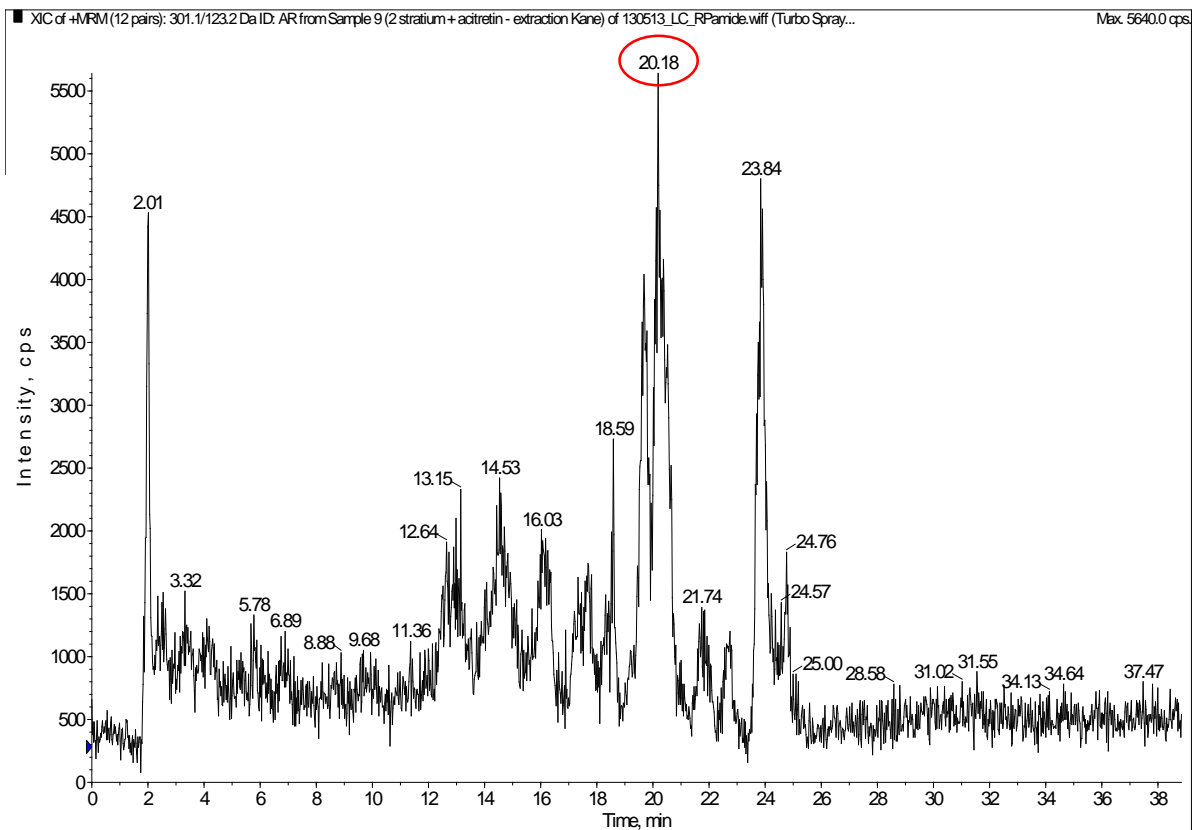
Toutes ces étapes ont été réalisées en maintenant au maximum les échantillons dans la glace (4°C) et en les protégeant de la lumière blanche (travailler en condition de lumière rouge).

Tout d'abord, des essais d'extraction ont été réalisés sur les solutions commerciales. Puis plusieurs essais ont été réalisés sur les tissus. Etant donné la faible quantité d'AR présente dans les tissus (de l'ordre du nM), il nous a fallu augmenter la quantité de tissus à extraire pour 1 échantillon (soit : 2 hippocampes entiers, 2 striatum entiers, 2 cortex préfrontal entiers, 2mL de sérum ou encore 0,5g de foie). Dans ces conditions, la détection de l'AR a été possible (*Figure 35*).

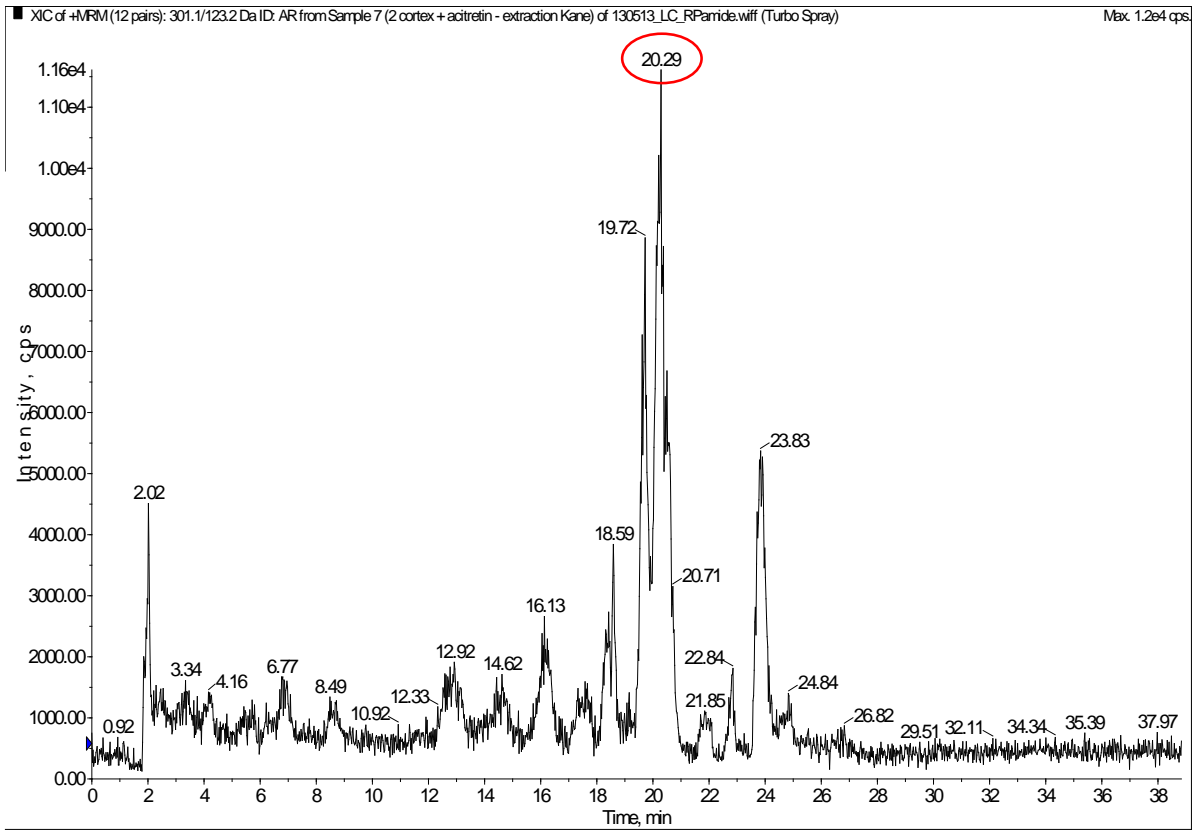
A



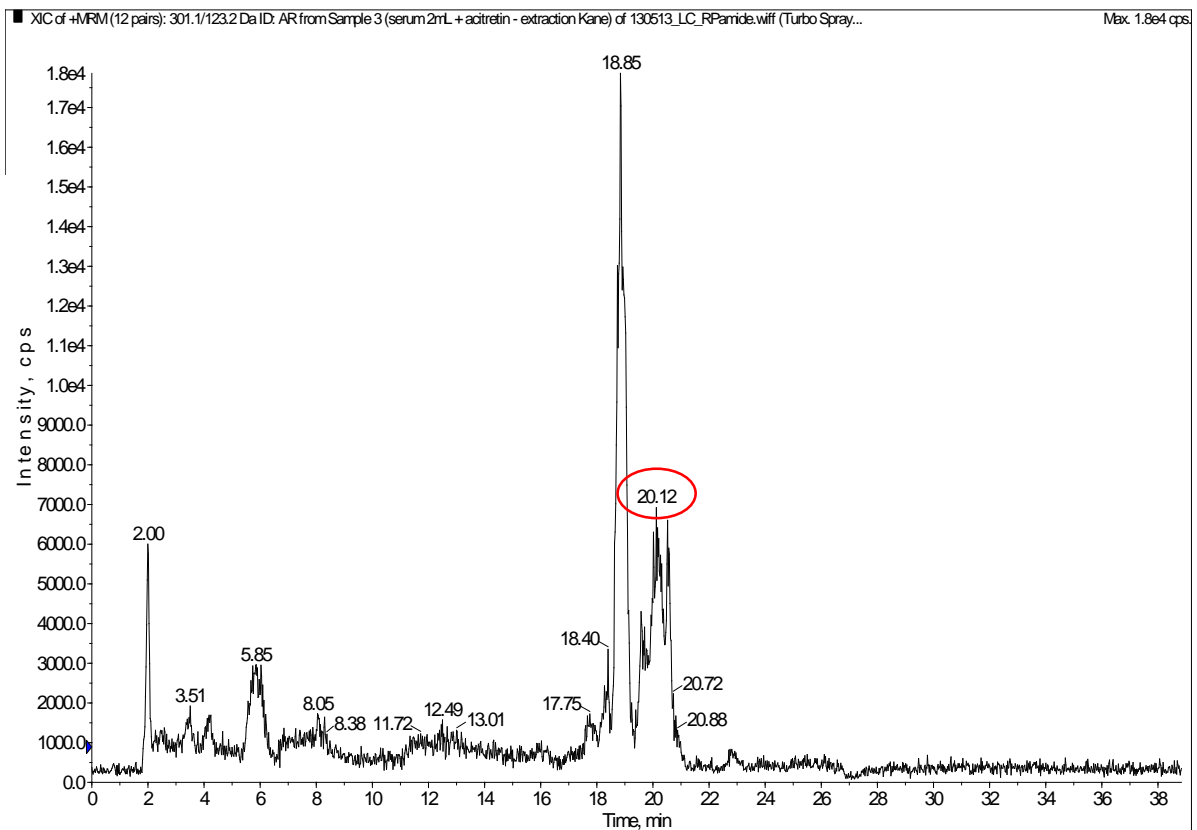
B



C



D



E

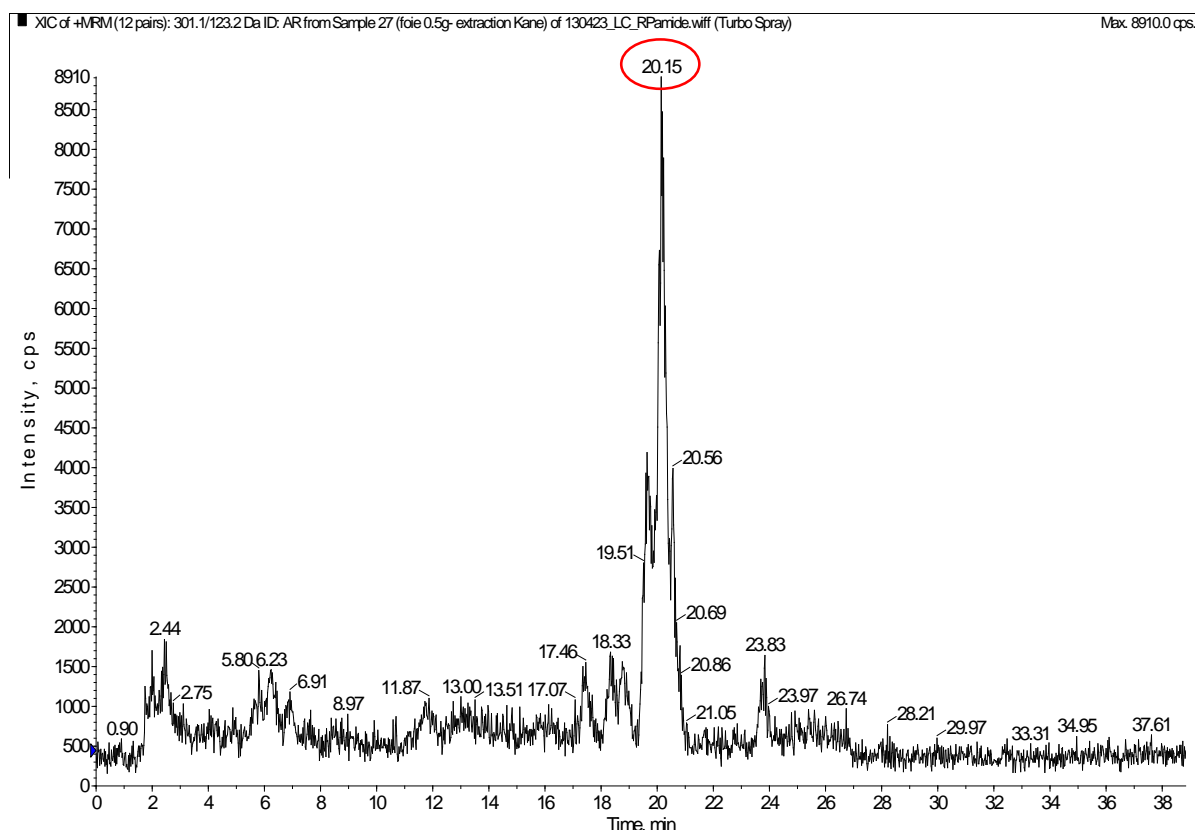


Figure 35 : Spectres de masse des échantillons issus de tissus biologiques de rat. A. Spectre de masse de l'AR dans l'hippocampe. B. Spectre de masse de l'AR dans le striatum. C. Spectre de masse de l'AR dans le cortex. D. Spectre de masse de l'AR dans le sérum. E. Spectre de masse de l'AR dans le foie. Entouré en rouge : l'AR. Les transitions de phase présentées sont celles de plus forte intensité : 123,2Da.

Dans nos conditions, pour tous les échantillons le seuil de détection a été atteint (rapport signal/bruit > 3). En revanche, nous sommes en limite de seuil de quantification (rapport signal/bruit > 10) pour certains échantillons : Hippocampe=11,6 ; Striatum=7,7 ; Cortex=15,6 ; Plasma=10,5 ; Foie=12,8. Un travail considérable reste à fournir pour dépasser définitivement cette valeur seuil avec tous les échantillons. Cela passe par des essais visant à concentrer au maximum l'AR dans les échantillons (diminution du volume de reprise à la fin de l'extraction), ou à injecter un volume d'échantillon plus important dans l'CLHP (augmentation du volume d'injection par changement de la boucle d'injection). Enfin, d'autres pistes pourraient être exploitées comme l'utilisation d'un four pour chauffer la colonne de chromatographie et ainsi améliorer son efficacité.

IV. Perspectives

Une fois la quantification de l'AR mise au point, nous étudierons l'effet sur le niveau d'AR d'une carence en vitamine A chez des jeunes rats Wistar ayant reçu un régime nutritionnel dépourvu de vitamine A. La possibilité de normaliser le niveau d'AR dans le sérum et les structures cérébrales, par des injections d'AR ou par une supplémentation nutritionnelle en vitamine A, sera également étudiée. Après sacrifice de ces 4 groupes de rats (Contrôle, Carencés, Carencés + AR, Carencés + Vitamine A) les prélèvements sanguins seront réalisés et les structures cérébrales seront prélevées afin de doser l'AR dans ces différents tissus.

Ce modèle nutritionnel de carence en vitamine A, parfaitement maîtrisé par notre équipe, induit une hypo-activité de la voie des rétinoïdes et mime en cela les effets du vieillissement mnésique. Nous avons récemment montré qu'un régime carencé en vitamine A chez le rat conduisait à des troubles de la mémoire spatiale associés à des altérations de plasticité cérébrale dans l'hippocampe. Ces effets sont corrigés chez des rats carencés ayant reçu un traitement par l'acide rétinoïque (Bonnet et al., 2008).

Objectiver les variations de synthèse de l'AR en réponse aux différents régimes nous permettra de démontrer son implication dans la régulation de l'activité de sa voie de signalisation et les conséquences sur le maintien des processus mnésiques au cours du vieillissement.

DISCUSSION GÉNÉRALE

Il est maintenant bien établi que l'hypoexpression de la voie de signalisation des rétinoïdes survenant naturellement au cours du vieillissement participe à l'étiologie des déficits mnésiques hippocampiques observés au cours du vieillissement. D'autre part, plusieurs observations font état d'une hyperactivation de l'axe hypothalamo-hypophysaire (HPA), chez certains individus au cours du vieillissement, qui pourrait avoir des conséquences sur les processus cognitifs. Ainsi, la diminution de l'activité de la voie de signalisation des rétinoïdes et l'augmentation de l'activité des glucocorticoïdes, se manifestant de manière concomitante au cours du vieillissement, participeraient à l'étiologie du déclin cognitif lié à l'âge. De plus, de nombreuses études font état d'interactions entre ces deux voies de signalisation et montrent notamment une action inhibitrice des rétinoïdes sur l'activité des glucocorticoïdes.

Dans ce contexte, mon travail de thèse visait à mieux comprendre les interactions entre ces deux voies de signalisation et leurs conséquences sur les processus émotionnels et mnésiques. Ainsi, l'objectif principal de ce travail visait à répondre à la question suivante:

L'effet bénéfique d'une supplémentation nutritionnelle ou d'un traitement par l'AR sur les processus mnésiques passe-t-il au moins en partie par une action sur la voie de signalisation des glucocorticoïdes ?

Afin d'éprouver cette hypothèse, nous avons mis en œuvre une approche expérimentale qui consistait à restaurer l'activité de la voie de signalisation des rétinoïdes, diminuée au cours d'une carence en vitamine A ou au cours du vieillissement, par une supplémentation nutritionnelle en vitamine A ou par un traitement chronique par l'AR et à étudier leurs conséquences sur :

- L'activité des glucocorticoïdes (CORT libre intrahippocampique et plasmatique, activité et expression de la 11 β HSD-1 au niveau de l'hippocampe).
- Les processus de neurogenèse hippocampique.
- L'expression hippocampique de certains récepteurs des rétinoïdes et gènes impliqués dans la plasticité synaptique.
- Les performances des animaux dans des tests évaluant le comportement de type anxieux et la mémoire hippocampo-dépendante.

Les résultats de ces travaux ont contribué à préciser les liens existant entre le statut en vitamine A, le niveau d'activité des glucocorticoïdes et certains processus cognitifs dépendants de l'hippocampe.

I. Résumé des principaux résultats

I.1. Première étude : effet d'une carence et d'une supplémentation en vitamine A sur la voie d'activité des glucocorticoïdes et conséquences sur la neurogenèse et les processus émotionnels et mnésiques

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés aux conséquences d'une hypoactivité des rétinoïdes, induite par une carence en vitamine A, sur la voie de signalisation des glucocorticoïdes et leur impact sur les processus émotionnels et mnésiques. Par ailleurs, nous avons évalué l'effet d'une supplémentation nutritionnelle en vitamine A sur ces processus.

De manière intéressante, nos résultats montrent que le statut en vitamine A est capable de moduler les niveaux de corticostérone libre dans le plasma et dans l'hippocampe en agissant sur son transporteur la CBG mais également sur l'activité hippocampique de la 11 β -HSD1. Ainsi, la carence en vitamine A induit une augmentation des concentrations de corticostérone plasmatique et intrahippocampique qui pourrait être reliée à (i) une diminution de la capacité de liaison de son transporteur (la CBG) et (ii) une augmentation de l'activité hippocampique de la 11 β -HSD1. En revanche, une supplémentation en vitamine A de 4 semaines semble efficace pour corriger ces altérations.

Par ailleurs, nos résultats suggèrent que l'hyperactivité des glucocorticoïdes observée chez les animaux carencés en vitamine A pourrait avoir des conséquences délétères sur (i) les processus de mémoire hippocampo-dépendants évalués par exemple dans le labyrinthe aquatique de Morris, (ii) le comportement de type anxieux évalué dans le labyrinthe en croix surélevé et également (iii) les processus de plasticité cérébrale comme la neurogenèse hippocampique. De plus, la supplémentation en vitamine A pendant 4 semaines permet de contrecarrer les effets délétères d'une suractivation de la voie des glucocorticoïdes sur la mémoire, l'anxiété et les processus de plasticité cérébrale.

Cette première étude conforte l'hypothèse générale de la thèse qui postule que le statut en vitamine A peut moduler la voie de signalisation des glucocorticoïdes. En particulier, une baisse de la voie de signalisation des rétinoïdes serait à l'origine d'une hyperactivation de la

voie des glucocorticoïdes se traduisant au niveau périphérique et central par une augmentation du niveau de corticostérone libre. Ces effets étant associés à des altérations de plasticité cérébrale et des déficits cognitifs, il est possible d'envisager que cette modulation de la voie des glucocorticoïdes en fonction du statut en vitamine A pourrait impacter ces processus. Il reste toutefois des travaux complémentaires à réaliser afin d'établir un lien causal entre rétinoïdes, glucocorticoïdes et modulation des fonctions dépendantes de l'hippocampe.

1.2. Deuxième étude : effet d'une supplémentation en vitamine A ou d'un traitement par l'AR sur la voie d'activité des glucocorticoïdes et conséquences sur la plasticité synaptique et les processus mnésiques au cours du vieillissement

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés aux conséquences d'une supplémentation en vitamine A ou d'un traitement par l'AR sur la libération de corticostérone intrahippocampique et la prévention des déficits mnésiques chez la souris d'âge intermédiaire.

Nos résultats montrent tout d'abord que les deux approches utilisées pour rétablir l'activité de la voie de signalisation des rétinoïdes sont capables d'améliorer la mémoire contextuelle dépendante de l'hippocampe évaluée dans le test du CSD. En revanche, le traitement par l'AR s'est révélé plus efficace que la supplémentation en vitamine A. De plus, nous montrons que l'amélioration des performances chez les animaux traités par l'AR est associée à une augmentation de l'expression hippocampique de PSD-95. Ce résultat suggère que l'effet bénéfique de l'AR sur la mémoire passerait par une modulation des processus de plasticité synaptique. Dans la seconde expérience, nos résultats attestent d'une diminution de la libération de corticostérone intrahippocampique induite par un stress modéré (nouvel environnement à explorer) chez les animaux traités par l'AR. Par ailleurs, nous montrons que cette réduction des concentrations est associée à des variations dans l'expression hippocampique des récepteurs à l'acide rétinoïque $RAR\beta$ et $RAR\alpha$ suggérant une interaction forte entre la voie de signalisation des rétinoïdes et la libération intrahippocampique de corticostérone.

Cette seconde étude conforte l'hypothèse générale de la thèse qui postule que le statut en vitamine A peut moduler la voie de signalisation des glucocorticoïdes et plus précisément le niveau de corticostérone intrahippocampique chez l'animal d'âge intermédiaire. De plus, la stimulation de la voie de signalisation des rétinoïdes dans les stades précoces du déclin mnésique lié à l'âge s'avère efficace pour prévenir les altérations de mémoire hippocampo-dépendante. Comme précédemment, il reste à réaliser des travaux complémentaires pour

confirmer que l'action bénéfique des rétinoïdes sur la plasticité synaptique et sur les processus mnésiques passe bien par une réduction de l'activité des glucocorticoïdes au cours du vieillissement en déterminant les mécanismes d'action mis en jeu.

II. Effet du statut en vitamine A sur la voie d'action des glucocorticoïdes dans le modèle de carence en vitamine A

En accord avec les précédentes études sur des modèles d'animaux carencés en vitamine A (Cocco et al., 2002; Etchamendy et al., 2003b; Bonnet et al., 2008), nos travaux confirment les effets délétères d'une hyposignalisation des rétinoïdes sur les processus mnésiques dépendants de l'hippocampe : en effet, des déficits mnésiques ont été observés aussi bien dans le test de mémoire de référence de la piscine de Morris, dans le test de peur conditionnée au contexte ainsi que dans le test de reconnaissance dans le labyrinthe en Y. L'étude principale qui a fait l'objet d'une publication soumise dans *Frontiers in Behavioral Neuroscience* montre également que la carence en vitamine A conduit à des troubles liés à l'anxiété et à des altérations de neurogenèse hippocampique. De plus, une supplémentation en vitamine A de 4 semaines s'avère efficace pour corriger ces déficits cognitifs ainsi que les altérations de plasticité hippocampique.

En considérant que la concentration de corticostérone au niveau cérébral dépend à la fois des niveaux circulants de l'hormone libre mais également de sa synthèse intracellulaire par la 11 β -HSD1 (Yau and Seckl, 2012), nous avons cherché à mieux comprendre le rôle modulateur des rétinoïdes sur l'activité de la voie des glucocorticoïdes aussi bien au niveau périphérique qu'au niveau hippocampique et son impact sur la neurogenèse hippocampique, sur les processus émotionnels et mnésiques.

II.1. Effet du statut en vitamine A sur le niveau de corticostérone plasmatique et hippocampique

La production de corticostérone (ou cortisol chez l'homme), produit final de l'axe HPA, est assurée par les glandes surrénales. Elle est ensuite libérée dans le plasma sous forme active (CORT) ou sous forme inactive (11-desoxyCORT), liée ou non à la transcortine (CBG) et transportée jusqu'au niveau des structures cérébrales cibles. Dans les cellules cibles, la forme libre non liée à la CBG provenant de la périphérie, va agir directement sur les

récepteurs GR et/ou MR alors que la forme inactive va être convertie en forme active par l'enzyme 11 β -HSD1 avant de se fixer sur ses récepteurs. Compte tenu de la forte densité des récepteurs GR et MR au niveau de l'hippocampe, cette structure cérébrale apparaît comme une cible privilégiée des glucocorticoïdes (de Kloet et al., 2005; Datson et al., 2008).

II.1.1. Statut en vitamine A, CBG et axe corticotrope

Ainsi, nos résultats montrent que la carence en vitamine A induit une augmentation de la fraction libre de la corticostérone plasmatique, mesurée en condition basale, ce niveau étant normalisé par la supplémentation en vitamine A.

Notre étude suggère que cette augmentation de corticostérone libre, pourrait être directement liée à la diminution de la capacité de liaison de la CBG observée chez ces mêmes animaux. En effet, la CBG qui lie 90 % de la corticostérone circulante en condition basale, agirait comme une protéine tampon réduisant les niveaux plasmatiques de corticostérone libre et son accessibilité aux structures cérébrales cibles (Moisan, 2010; Richard et al., 2010). Par ailleurs, la supplémentation en vitamine A s'est révélée efficace pour corriger la diminution de CBG circulante, renforçant l'idée d'une forte interaction entre statut en vitamine A, CBG et modulation des niveaux de glucocorticoïdes circulants. De plus, une étude réalisée sur des hépatocytes de rat montre que l'AR serait capable de moduler la synthèse de CBG via ses récepteurs nucléaires (Elfahime et al., 1996).

D'autre part, un effet antagoniste de la voie des rétinoïdes sur l'activité de l'axe corticotrope pouvait être également envisagé pour expliquer l'augmentation de corticostérone plasmatique libre. En effet, cet effet inhibiteur a déjà été mis en évidence dans un modèle expérimental de maladie de Cushing où il a été montré un effet bénéfique de l'AR sur l'hypersécrétion de corticostérone plasmatique totale induite par des tumeurs surrenaliennes (Paez-Pereda et al., 2001). Plus récemment, il a également été mis en évidence dans notre équipe, une régulation de l'activité de l'axe corticotrope par le statut vitaminique A chez le rat LOU/C (Arvy et al., 2013). Ainsi, dans cette étude, il a été montré une hyperactivation de l'axe HPA chez l'animal carencé se traduisant par une augmentation des concentrations en corticostérone plasmatique en condition basale et après induction d'un stress aigu, ces effets pouvant être normalisés par un traitement par l'AR. En accord avec ces données, nos travaux montrent une augmentation de la corticostérone libre plasmatique en condition basale chez les animaux carencés restaurée par la supplémentation en vitamine A. Ces effets pourraient donc être reliés à une hyperactivation de l'axe corticotrope. En revanche, il a été montré qu'une

administration chronique d'AR all-*trans* pendant 6 semaines induisait une augmentation d'expression de CRH au niveau de l'hypothalamus, associé à une augmentation du niveau basal de corticostérone. Cette divergence de résultats pourrait être attribuée au type de traitement utilisé (durée, doses, supplémentation nutritionnelle ou traitement pharmacologique) ou au statut nutritionnel des animaux (statut normal ou déficient). En effet, des études montrent qu'une injection prolongée d'AR à des doses élevées chez des animaux présentant un statut en vitamine A normal entraînaient des altérations de plasticité cérébrale, des troubles de type anxieux ainsi que des déficits mnésiques (Crandall et al., 2004; Cai et al., 2010). En particulier, dans l'étude de Cai et al., (2010), l'hyperactivité de l'axe corticotrope pourrait être à l'origine d'une augmentation d'anxiété observée dans le test du plus-maze et d'une diminution d'activité exploratoire dans le test d'open-field. Dans notre étude, une supplémentation en vitamine A de 4 semaines ne semble pas modifier le comportement émotionnel des animaux témoins : en effet, le niveau d'anxiété des rats ayant reçu un régime enrichi en vitamine A pendant 4 semaines, est identique à celui des rats témoins ayant reçu un régime normal. En revanche, nos résultats montrent une augmentation du niveau d'anxiété chez les rats carencés en vitamine A qui est normalisé par une supplémentation en vitamine A de 4 semaines. Dans nos conditions, la supplémentation nutritionnelle en vitamine A de 4 semaines permettrait l'obtention de doses intracellulaires physiologiques de métabolite actif, n'engendrant pas d'effets délétères chez des animaux ayant un statut en vitamine A normal. Des effets bénéfiques de la supplémentation seraient au contraire observés sur les niveaux de corticostérone plasmatique et les fonctions hippocampiques chez des animaux présentant un statut en vitamine A altéré. Toutefois, ces études n'étant que corrélatives, il reste à déterminer plus précisément s'il existe un lien entre niveau de corticostérone plasmatique et troubles liés à l'anxiété.

II.1.2. Statut en vitamine A et 11 β -HSD1 au niveau de l'hippocampe

En plus d'une augmentation de corticostérone libre circulante, les animaux carencés en vitamine A présentent également une augmentation des niveaux de corticostérone hippocampique. Les niveaux de corticostérone dans les structures cérébrales dépendent de 3 paramètres essentiels : l'activité de l'axe corticotrope, le niveau de CBG mais également l'activité de la 11 β -HSD1. Cette enzyme catalyse la formation de la corticostérone active au sein des tissus (Seckl, 1997; Yau and Seckl, 2012). Nos résultats montrent que la carence en vitamine A augmente l'activité hippocampique de la 11 β -HSD1 alors que la supplémentation

contrecarre cet effet. Ces résultats sont en accord avec des données récentes de la littérature : en effet, ce rôle inhibiteur des rétinoïdes sur l'activité et l'expression de la 11 β -HSD1 a été montré (i) *in vitro* dans des cellules de myotubes C2C12 (Aubry and Odermatt, 2009) (ii) dans le foie de rats obèses (Sakamuri et al., 2011) et récemment (iii) dans l'hippocampe de rats LOU/C carencés en vitamine A (Arvy et al., 2013). De plus, la modulation de l'activité de la 11 β -HSD1 pourrait passer par une régulation négative via un récepteur nucléaire des rétinoïdes, comme suggéré dans l'étude *in vitro* par Aubry and Odermatt, 2009.

Ainsi, l'ensemble de ces résultats suggèrent que l'augmentation de la corticostérone hippocampique observée chez le rat carencé résulterait à la fois, d'une augmentation de corticostérone libre plasmatique mais également d'une augmentation de l'activité et de l'expression de la 11 β -HSD1 dans l'hippocampe.

II.2. Conséquences d'une augmentation de corticostérone intrahippocampique sur la plasticité cérébrale et les processus mnésiques dépendants de l'hippocampe.

II.2.1. Statut en vitamine A, glucocorticoïdes et processus mnésiques

La mise en évidence, dans notre étude, de corrélations négatives entre le niveau de corticostérone intrahippocampique et les performances mnésiques des animaux en fonction de leur statut en vitamine A, suggère un lien causal entre élévation de corticostérone hippocampique chez les animaux carencés en vitamine A et déficits mnésiques. En effet, de nombreuses études chez l'homme comme chez le rongeur mettent en relation des niveaux élevés de glucocorticoïdes circulants avec des perturbations de leur capacités mnésiques (Issa et al., 1990; Yau et al., 1995; Lupien et al., 1998). De plus, il a été montré récemment sur un modèle de souris KO CBG, que le niveau de CBG circulant pouvait non seulement moduler le niveau de corticostérone intrahippocampique mais également les processus de mémoire dépendants de l'hippocampe (Minni et al., 2012). Enfin, une surexpression de la 11 β -HSD1 a été mise en évidence chez l'animal âgé et serait corrélée aux déficits mnésiques détectés dans la piscine de Morris (Yau et al., 1995; Holmes et al., 2010; Yau and Seckl, 2012). Par ailleurs, de manière similaire à ce que nous observons après la supplémentation en vitamine A, la réduction de l'activité de l'enzyme 11 β -HSD1, que ce soit par l'inactivation de son gène ou par l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques, est associée à une amélioration des performances mnésiques (Yau et al., 2001; Yau et al., 2007; Sooy et al., 2010; Mohler et al., 2011).

Par la suite, nous avons cherché à mieux comprendre, si ce dysfonctionnement de la voie d'activité des glucocorticoïdes induite par une carence en vitamine A pouvait être à l'origine des altérations de plasticité cérébrale telles que la neurogenèse hippocampique connue pour sous-tendre certains déficits mnésiques dépendants de l'hippocampe.

II.2.2. Statut en vitamine A, glucocorticoïdes et neurogenèse

Parmi les facteurs susceptibles de moduler les processus de neurogenèse figure la vitamine A et les glucocorticoïdes. Ainsi, notre étude montre qu'une carence en vitamine A de 14 semaines provoque une diminution du nombre de neurones néoformés au niveau du GD. De plus, une supplémentation en vitamine A de 4 semaines permet de restaurer le niveau de neurogenèse chez les rats carencés en vitamine A. Ces résultats sont en accord avec une étude précédente réalisée dans notre laboratoire qui a également montré qu'une carence en vitamine A de 14 semaines entraînait une diminution du nombre de neurones néo-formés associées à l'apparition de déficits d'apprentissage et de mémoire spatiale en piscine de Morris. De plus, l'administration d'AR provoquait une stimulation de la neurogenèse hippocampique concomitante à la disparition des déficits cognitifs chez les animaux carencés en vitamine A (Bonnet et al., 2008). Ainsi, il a été montré pour la première fois, qu'une supplémentation nutritionnelle en vitamine A de 4 semaines était capable, de la même manière qu'une administration d'AR, de rétablir le niveau de neurogenèse hippocampique dans un modèle de carence en vitamine A.

Par ailleurs, la neurogenèse est fortement inhibée par les glucocorticoïdes (Cameron and Gould, 1994; Gould and Tanapat, 1999). Dans notre étude, nous avons observé qu'une carence en vitamine A induit une augmentation corticostérone libre au niveau plasmatique et hippocampique qui pourrait être à l'origine des altérations de neurogenèse observées. De plus, la neurogenèse hippocampique étant impliquée dans la formation des traces mnésiques (Kempermann et al., 1997; Gould et al., 1999), les altérations de neurogenèse mises en évidence chez les rats carencés en vitamine A pouvaient sous-tendre l'apparition des déficits de mémoire chez ces animaux dans la piscine de Morris. La formation hippocampique présente une grande vulnérabilité face aux stress chroniques et aux processus de vieillissement. Un stress prénatal inhibe la neurogenèse "basale" de l'adolescence à la sénescence (Lemaire et al., 2000) et les rats âgés présentant des troubles de l'apprentissage ont une neurogenèse "basale" inférieure à celle des rats de même âge ayant des capacités mnésiques préservées (Drapeau et al., 2003). Le rôle de la corticostérone a été évalué chez les

animaux stressés prénatalement et les animaux sénescents qui développent des perturbations cognitives présentent une dérégulation de l'axe corticotrope associée à une hypercorticostéronémie. Il a été démontré que la corticostérone inhibe la neurogenèse chez les rats jeunes et les rats âgés (Lemaire et al., 1999) et qu'une surrénalectomie réalisée en milieu de vie (à 12 mois) améliore les fonctions cognitives et stimule la neurogenèse chez les animaux âgés de 24 mois (Montaron et al., 2003). Enfin, certains auteurs ont pu montrer que des souris invalidées pour le gène de la 11 β -HSD1 présentaient une augmentation de neurogenèse hippocampique et suggèrent qu'une diminution du niveau de corticostérone intrahippocampique chez ces souris, les protégerait en partie contre les altérations de neurogenèse hippocampique apparaissant au cours du vieillissement (Yau et al., 2007).

Ces résultats sont en faveur de l'existence d'une boucle physiopathologique corticostérone-neurogenèse-hippocampe-apprentissage. L'hippocampe altéré ne serait plus capable d'exercer un rétrocontrôle négatif sur l'axe corticotrope. Cette hypothèse est confortée par une étude montrant qu'une suppression de neurogenèse hippocampique induit une hyperactivation de l'axe corticotrope (Schloesser et al., 2009).

II.3. Perspectives

Dans cette étude, nous avons confirmé l'effet antagoniste de la voie de signalisation des rétinoïdes sur celle des glucocorticoïdes. Cependant, le(s) mécanisme(s) par le(s)quel(s) le statut en vitamine A module l'activité des glucocorticoïdes reste non élucidé. Pour mieux comprendre les mécanismes cellulaires, nous envisageons d'activer ou d'inactiver certains récepteurs des rétinoïdes (agonistes, antagonistes, anti-sens) et de mesurer les conséquences sur l'expression de gènes cibles impliqués dans la voie de signalisation des glucocorticoïdes. Certaines pistes de recherche ont permis d'identifier le BDNF comme gène cible d'interaction des deux voies de signalisation (Brossaud et al., 2013). Ceci permettrait de mieux caractériser les récepteurs impliqués spécifiquement dans la modulation de ces processus, et ainsi pouvoir tester des agonistes de ces récepteurs comme candidats dans le traitement de certaines maladies conduisant à des déficits cognitifs.

Afin d'approfondir nos résultats, il serait également intéressant d'utiliser des approches pharmacologiques avec des inhibiteurs spécifiques de 11 β -HSD1 visant notamment à réduire l'activité de la 11 β -HSD1 dans l'hippocampe chez l'animal carencé (Sooy et al., 2010; Mohler et al., 2011). Ainsi, de telles approches permettraient d'établir un lien causal

entre hyposignalisation de la voie des rétinoïdes, hypersécrétion de corticostérone intrahippocampique et troubles émotionnels et mnésiques.

III. Effet du statut en vitamine A sur la voie d'action des glucocorticoïdes au cours du vieillissement

Chez certains individus âgés, un dysfonctionnement de la voie d'action des GC au niveau hippocampique a été suggéré comme un mécanisme pouvant sous-tendre l'apparition du déclin cognitif lié à l'âge (Conrad and Bimonte-Nelson, 2010). De ce fait, la corticostérone en plus de la vitamine A, est un facteur important à prendre en compte pour élucider les mécanismes impliqués dans l'apparition des déficits mnésiques dépendants de l'hippocampe au cours du vieillissement. Le but de cette étude était d'explorer l'implication des rétinoïdes dans la modulation de la libération de corticostérone intrahippocampique chez la souris d'âge intermédiaire et son impact sur la plasticité cérébrale et les fonctions hippocampiques.

III.1. Effet d'une stimulation de la voie des rétinoïdes sur la mémoire contextuelle dans le test du CSD et les processus de plasticité synaptique chez la souris d'âge intermédiaire

III.1.1. Vitamine A et mémoire au cours du vieillissement

L'un des enjeux majeurs de la société actuelle concerne le "mieux vieillir", avec l'identification des facteurs permettant de retarder l'apparition des déficits mnésiques liés à l'âge. Il s'agit alors d'intervenir tôt au cours du vieillissement, avant l'apparition d'altérations irréversibles. Afin de tester les effets de la stimulation de la voie de signalisation des rétinoïdes dans la prévention du déclin cognitif lié à l'âge nous avons utilisé des souris au milieu de leur vie (14-15 mois), que nous avons soumis à un test de mémoire hippocampo-dépendant (Chauveau et al., 2009a) spécifiquement conçu et validé pour détecter les déficits mnésiques de manière précoce au cours du vieillissement (Celerier et al., 2004; Beracochea et al., 2008a; Beracochea et al., 2008b; Chauveau et al., 2009b; Chauveau et al., 2009a; Pierard et al., 2009; Tronche et al., 2010). Les souris âgées de 14 mois présentaient un déficit de mémoire spatiale sérielle contextuelle comme observé précédemment par (Tronche et al., 2010) dans le test du CSD. En effet, elles étaient incapables 24h après l'acquisition de retenir

la discrimination D1 lors de la phase test, qui correspond à l'information la plus ancienne. Ce même profil comportemental a été observé chez des souris jeunes, stressées juste avant le test comportemental (Celerier et al., 2004; Chauveau et al., 2010). Nos résultats montrent de manière originale qu'un traitement par l'AR, au même titre qu'une supplémentation en vitamine A, de 2 mois est capable d'améliorer les performances mnésiques hippocampo-dépendantes dans le test du CSD chez la souris d'âge intermédiaire. En revanche, le traitement par l'AR s'est révélé plus efficace que la supplémentation en vitamine A. Il est tout à fait envisageable qu'une supplémentation plus longue et/ou avec une quantité de rétinol plus importante comme dans le protocole décrit par Touyarot et al., (2013) puisse être aussi efficace que le traitement par l'AR. En effet, ces auteurs montrent un effet bénéfique d'une supplémentation nutritionnelle en vitamine A débutée à mi-vie, comme dans notre étude, mais prolongée pendant 4 mois (au lieu de 2 mois) à une dose de 45UI rétinol/g (au lieu de 20UI rétinol/g) sur la plasticité cérébrale et les performances mnésiques des animaux âgés.

III.1.2. Vitamine A et plasticité synaptique au cours du vieillissement

Il a déjà été montré que l'administration d'AR à une dose de 150µg/kg (dose utilisée dans notre étude) ou une supplémentation en vitamine A augmente l'activité de la voie de signalisation des rétinoïdes au cours du vieillissement se traduisant par un rétablissement du niveau d'expression de certains récepteurs nucléaires RAR/RXR (Enderlin et al., 1997b; Etchamendy et al., 2001; Mingaud et al., 2008). De plus, cette augmentation d'expression des récepteurs RAR et RXR a été associée à une normalisation du niveau d'expression des gènes cibles codant pour des protéines impliquées dans les processus de plasticité synaptique tels que RC3, et à une correction des déficits mnésiques (Etchamendy et al., 2001). D'autre part, d'autres études montrent qu'une supplémentation en vitamine A démarrée très tôt chez la souris jeune mais également chez le rat d'âge moyen normalise les altérations de plasticité synaptique et de neurogenèse hippocampique qui apparaissent au cours du vieillissement (Mingaud et al., 2008; Touyarot et al., 2013). Afin de mieux caractériser les mécanismes impliqués dans l'amélioration de la mémoire chez le sujet à mi-vie, nous avons étudié l'expression de certains gènes cibles des rétinoïdes (RC3, GAP-43...) connus pour être impliqués dans les processus de plasticité synaptique. Nos résultats montrent une augmentation de l'expression hippocampique de PSD-95 par le traitement par l'AR alors que l'expression des autres gènes connus pour être cibles des rétinoïdes ne sont pas modulés. PSD-95, protéine post-synaptique, est bien connue pour son implication dans les fonctions

mnésiques (Migaud et al., 1998; Carlisle et al., 2008) : elle serait impliquée principalement dans le recrutement des récepteurs NMDA et AMPA et des canaux ioniques en réponse à l'activité synaptique (Kim et al., 1995; Beique et al., 2006; Vickers et al., 2006). De plus, des données récentes ont montré (i) que l'altération de PSD-95 hippocampique était associée à des déficits d'apprentissage chez le rat âgé (Nyffeler et al., 2007) et (ii) une corrélation positive entre la diminution de l'expression hippocampique de PSD-95 et des altérations de mémoire spatiale (VanGuilder et al., 2011). De plus, ce gène serait également modulé négativement au niveau de l'hippocampe après une exposition excessive de corticostérone (Cohen et al., 2011). Ainsi, PSD-95 apparaît comme un nouveau gène cible des rétinoïdes et des glucocorticoïdes, jouant un rôle important dans les processus de plasticité synaptique et capable d'être modulé précocement au cours du vieillissement.

III.2. Effet d'un traitement par l'AR sur la libération de corticostérone hippocampique chez la souris d'âge intermédiaire : conséquences sur la mémoire sérielle contextuelle ?

Pour mieux comprendre les mécanismes qui pourraient être impliqués dans la régulation des processus de plasticité et de mémorisation suite au traitement par l'AR, nous avons étudié le rôle modulateur de l'AR sur la libération de corticostérone intrahippocampique chez la souris d'âge moyen. Nos résultats montrent une augmentation de la libération de corticostérone dans l'hippocampe chez les souris âgées de 14 mois suite à un stress comportemental. Le traitement par l'AR induit une diminution de cette libération de corticostérone hippocampique et un décalage dans la cinétique de libération. Les travaux de Tronche et al., (2010) ont montré également chez la souris d'âge intermédiaire une augmentation de grande ampleur et de longue durée des niveaux de corticostérone libérés suite à l'induction d'un choc électrique. Cette augmentation avait été associée à des déficits de mémoire contextuelle dans le test du CSD. De manière intéressante, l'injection de métyrapone, un inhibiteur de synthèse de corticostérone inhibe la libération de corticostérone et supprime les effets du stress sur les performances de mémoire dans le test du CSD. Comme observé avec la métyrapone, nous pouvons supposer qu'un traitement par l'AR modulerait le stress induit par le test comportemental favorisant les processus de mémorisation. Cette hypothèse est encore confortée par des travaux montrant que les effets du niveau de stress sur les processus de consolidation au cours de l'apprentissage suivent une courbe en U avec un

niveau de stress qui doit être optimal afin d'éviter les problèmes de mémorisation (Salehi et al., 2010).

Nos résultats montrent également que les niveaux de corticostérone intrahippocampique sont corrélés avec l'expression de certains récepteurs des rétinoïdes. En particulier, une diminution de l'expression du RAR α et une augmentation de celle du RAR β pourraient contribuer à la réduction de l'amplitude de la libération de la corticostérone observée chez les souris traitées par l'AR. D'autre part, nos résultats ne montrent aucune modulation de l'expression du gène codant pour l'enzyme 11 β -HSD1 au niveau de l'hippocampe suggérant que d'autres mécanismes pourraient expliquer la modulation de la corticostérone hippocampique. En effet, la surexpression de la 11 β -HSD1 avec l'âge (Holmes et al., 2010) ou lors d'une carence en vitamine A, comme observé dans l'étude précédente, corrèle avec la présence de déficits mnésiques. Ainsi, nous nous attendions à une augmentation d'expression de cette enzyme chez la souris d'âge intermédiaire. L'absence d'effet sur son expression au niveau hippocampique nous a conduit à émettre l'hypothèse selon laquelle l'action inhibitrice de l'AR sur la libération corticostérone hippocampique pourrait passer par une modulation de l'axe corticotrope qui conduirait à une diminution des niveaux de corticostérone plasmatique. En effet, d'autres études ont montré l'action inhibitrice de l'AR sur la production de corticostérone par les surrénales lors d'une hyperactivité de l'axe corticotrope dans un modèle expérimental de syndrome de Cushing (Paez-Pereda et al., 2001) suggérant que ce traitement pourrait être envisagé pour prévenir les déficits mnésiques observés chez ces patients (Starkman et al., 1992b).

III.3. Perspectives

Même si les résultats que nous avons obtenus ouvrent de nouvelles perspectives dans la mise place d'une prévention nutritionnelle du déclin cognitif chez le sujet âgé, il apparait important d'affiner la dose et la durée de supplémentation qui permettraient d'obtenir des effets comparables à ceux observés avec un traitement par l'AR. Des résultats récents obtenus au laboratoire révèlent la pertinence d'une approche nutritionnelle par supplémentation en vitamine A comme voie de prévention possible de déficits mnésiques liés au vieillissement. En effet, cette approche nutritionnelle permet le maintien des performances de mémoire spatiale ainsi que la stimulation des processus de neurogenèse (Touyarot et al., 2013). Les glucocorticoïdes jouent également un rôle important dans la modulation des processus de neurogenèse. Pour compléter notre étude, il reste à vérifier si l'effet de l'administration d'AR

ou d'une supplémentation en vitamine A plus prolongée sur la libération de corticostérone hippocampique ne pourraient pas influencer en plus des processus de plasticité synaptique, les processus de neurogenèse connus pour sous-tendre les fonctions mnésiques.

IV. Conclusion générale et perspectives thérapeutiques

Nos résultats contribuent à la démonstration d'un effet antagoniste de l'activation de la voie de signalisation des rétinoïdes sur l'augmentation des niveaux de corticostérone hippocampique observée au cours d'une carence en vitamine A et du vieillissement. Ces deux études indiquent qu'il est important de prendre en considération la modulation du statut en glucocorticoïdes par la voie de signalisation des rétinoïdes et suggèrent l'action concomitante des deux voies de signalisation sur les processus de plasticité et les fonctions hippocampiques.

Les connaissances sur les mécanismes responsables des déficits cognitifs liés au vieillissement représentent un intérêt important pour l'ensemble de la communauté scientifique. En effet, le vieillissement normal et pathologique entraîne progressivement une dépendance croissante, génératrice d'un fardeau économique et social. Les facteurs de risques des atteintes neurobiologiques et cognitives du sujet âgé sont malheureusement mal connus. C'est pourquoi il est urgent d'identifier et de mettre en place des stratégies préventives afin de retarder l'apparition des troubles cognitifs et des démences.

Certaines études suggèrent l'intervention des voies de signalisation des rétinoïdes et des glucocorticoïdes dans l'étiologie de la maladie d'Alzheimer (Goodman and Pardee, 2003; Ding et al., 2008; Notarianni, 2013). Des résultats obtenus post-mortem sur des cerveaux de patients atteints de la maladie montrent que la voie d'action des rétinoïdes est particulièrement altérée chez ces sujets (Corcoran et al., 2004). Des résultats originaux obtenus au laboratoire chez l'animal carencé en vitamine A, montrent que l'hypoexpression des récepteurs des rétinoïdes s'accompagne d'une diminution de l'expression de certains gènes cibles impliqués dans les processus d'amyloïdogenèse (Husson et al., 2006). Dans cette même étude, un traitement par l'AR a permis de normaliser le taux des récepteurs ainsi que le niveau des indicateurs des dépôts amyloïdes. Ces résultats sont en accord avec d'autres travaux qui avaient montré qu'une carence en vitamine A prolongée conduit à la formation de dépôts A β chez le rat adulte (Corcoran et al., 2004). L'acide rétinoïque aurait des effets inhibiteurs sur la formation et l'agrégation des protéines β amyloïdes (Ono et al., 2004; Sahin et al., 2005) et permettrait une amélioration des processus mnésiques dans un modèle de souris Alzheimer

(Sodhi and Singh, 2013). En ce qui concerne l'implication de la voie de signalisation des glucocorticoïdes, il a été suggéré qu'un excès de cette hormone favoriserait la formation de protéines τ et β amyloïdes dans un modèle de souris Alzheimer (Green et al., 2006).

L'alimentation, facteur environnemental auquel l'individu est exposé durant toute sa vie, fait partie des nouvelles pistes de recherche. Une prévention axée sur les facteurs nutritionnels tels que la vitamine A, permettraient de prévenir simultanément un ensemble de pathologies dont la fréquence augmente avec l'âge, comme la maladie d'Alzheimer.

L'ensemble de ces données permettront de contribuer à une meilleure connaissance de l'intervention de la vitamine A dans les processus neurobiologiques qui sous-tendent les processus cognitifs. Au plan de la recherche finalisée, les résultats acquis pourront contribuer à une meilleure définition des recommandations nutritionnelles du sujet âgé et/ou du développement d'aliments fonctionnels. Dans la continuité de ces travaux, un projet NUTRIMEMO vise à déterminer s'il existe une relation entre les performances cognitives des sujets âgés évaluées dans une épreuve en labyrinthe virtuel et le statut vitaminique A des patients évalué par la mesure de l'expression des récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque dans les cellules mononuclées du sang. Le labyrinthe virtuel permettant de mettre en évidence la mise en place de stratégies spatiales chez l'Homme (Etchamendy and Bohbot, 2007). A plus long terme, l'investigation du rôle des rétinoïdes dans le vieillissement pathologique (i.e. maladie d'Alzheimer) pourrait être envisagée.

RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Abrahams S, Pickering A, Polkey CE, Morris RG (1997) Spatial memory deficits in patients with unilateral damage to the right hippocampal formation. *Neuropsychologia* 35:11-24.
- Abrous DN, Koehl M, Le Moal M (2005) Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. *Physiol Rev* 85:523-569.
- Aguilera G (1994) Regulation of pituitary ACTH secretion during chronic stress. *Front Neuroendocrinol* 15:321-350.
- Aimone JB, Wiles J, Gage FH (2006) Potential role for adult neurogenesis in the encoding of time in new memories. *Nat Neurosci* 9:723-727.
- Aisa B, Tordera R, Lasheras B, Del Rio J, Ramirez MJ (2007) Cognitive impairment associated to HPA axis hyperactivity after maternal separation in rats. *Psychoneuroendocrinology* 32:256-266.
- Alfos S, Boucheron C, Pallet V, Higuieret D, Enderlin V, Beracochea D, Jaffard R, Higuieret P (2001) A retinoic acid receptor antagonist suppresses brain retinoic acid receptor overexpression and reverses a working memory deficit induced by chronic ethanol consumption in mice. *Alcohol Clin Exp Res* 25:1506-1514.
- Alliot J, Boghossian S, Jourdan D, Veyrat-Durebex C, Pickering G, Meynial-Denis D, Gaumet N (2002) The LOU/c/jall rat as an animal model of healthy aging? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 57:B312-320.
- Alperovitch A, Amouyel P, Dartigues JF, Ducimetiere P, Mazoyer B, Ritchie K, Tzourio C (2002) [Epidemiological studies on aging in France: from the PAQUID study to the Three-City study]. *C R Biol* 325:665-672.
- Altman J (1962) Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science* 135:1127-1128.
- Ambrogini P, Orsini L, Mancini C, Ferri P, Ciaroni S, Cuppini R (2004) Learning may reduce neurogenesis in adult rat dentate gyrus. *Neurosci Lett* 359:13-16.
- Ambrogini P, Cuppini R, Cuppini C, Ciaroni S, Cecchini T, Ferri P, Sartini S, Del Grande P (2000) Spatial learning affects immature granule cell survival in adult rat dentate gyrus. *Neurosci Lett* 286:21-24.
- An JJ, Gharami K, Liao GY, Woo NH, Lau AG, Vanevski F, Torre ER, Jones KR, Feng Y, Lu B, Xu B (2008) Distinct role of long 3' UTR BDNF mRNA in spine morphology and synaptic plasticity in hippocampal neurons. *Cell* 134:175-187.

- Arfaoui A, Nasri I, Boulbaroud S, Ouichou A, Mesfioui A (2009) Effect of vitamin A deficiency on retinol and retinyl esters contents in rat brain. *Pak J Biol Sci* 12:939-948.
- Arfaoui A, Lobo MV, Boulbaroud S, Ouichou A, Mesfioui A, Arenas MI (2013) Expression of retinoic acid receptors and retinoid X receptors in normal and vitamin A deficient adult rat brain. *Ann Anat* 195:111-121.
- Arvy N, Hamiani R, Richard E, Moisan MP, Pallet V (2013) Vitamin A regulates HPA axis status in LOU/C rats. *J Endocrinol*.
- Asson-Batres MA, Zeng MS, Savchenko V, Aderoju A, McKanna J (2003) Vitamin A deficiency leads to increased cell proliferation in olfactory epithelium of mature rats. *J Neurobiol* 54:539-554.
- Aubry EM, Odermatt A (2009) Retinoic acid reduces glucocorticoid sensitivity in C2C12 myotubes by decreasing 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and glucocorticoid receptor activities. *Endocrinology* 150:2700-2708.
- Audouin-Chevallier I, Higuieret P, Pallet V, Higuieret D, Garcin H (1993) Dietary vitamin A modulates the properties of retinoic acid and glucocorticoid receptors in rat liver. *J Nutr* 123:1195-1202.
- Audouin-Chevallier I, Pallet V, Coustaut M, Alfos S, Higuieret P, Garcin H (1995) Retinoids modulate the binding capacity of the glucocorticoid receptor and its translocation from cytosol to nucleus in liver cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 52:321-328.
- Audouin I, Garcin H, Pailler-Rodde I, Higuieret P (1992) Vitamin A deficiency and glucocorticoid receptor activity in rat liver. *J Endocrinol* 133:169-173.
- Aust O, Sies H, Stahl W, Polidori MC (2001) Analysis of lipophilic antioxidants in human serum and tissues: tocopherols and carotenoids. *J Chromatogr A* 936:83-93.
- Azais-Braesco V, Moriniere C, Guesne B, Partier A, Bellenand P, Baguelin D, Grolier P, Alix E (1995) Vitamin A status in the institutionalized elderly. Critical analysis of four evaluation criteria: dietary vitamin A intake, serum retinol, relative dose-response test (RDR) and impression cytology with transfer (ICT). *Int J Vitam Nutr Res* 65:151-161.

B

- Bartus RT (2000) On neurodegenerative diseases, models, and treatment strategies: lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis. *Exp Neurol* 163:495-529.

- Bastien J, Rochette-Egly C (2004) Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. *Gene* 328:1-16.
- Beique JC, Lin DT, Kang MG, Aizawa H, Takamiya K, Huganir RL (2006) Synapse-specific regulation of AMPA receptor function by PSD-95. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:19535-19540.
- Benowitz LI, Routtenberg A (1997) GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity. *Trends Neurosci* 20:84-91.
- Beracochea D, Boucard A, Trocme-Thibierge C, Morain P (2008a) Improvement of contextual memory by S 24795 in aged mice: comparison with memantine. *Psychopharmacology (Berl)* 196:555-564.
- Beracochea D, Philippin JN, Meunier S, Morain P, Bernard K (2007) Improvement of episodic contextual memory by S 18986 in middle-aged mice: comparison with donepezil. *Psychopharmacology (Berl)* 193:63-73.
- Beracochea D, Liscia P, Tronche C, Chauveau F, Jouanin JC, Pierard C (2008b) Stress modulation of the memory retrograde-enhancing effects of the awakening drug modafinil in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 196:1-13.
- Bershad SV (2001) The modern age of acne therapy: a review of current treatment options. *Mt Sinai J Med* 68:279-286.
- Biesalski HK, Ehrental W, Gross M, Hafner G, Harth O (1983) Rapid determination of retinol (vitamin A) in serum by high pressure liquid chromatography (HPLC). *Int J Vitam Nutr Res* 53:130-137.
- Bizon JL, Gallagher M (2003) Production of new cells in the rat dentate gyrus over the lifespan: relation to cognitive decline. *Eur J Neurosci* 18:215-219.
- Bizon JL, Lee HJ, Gallagher M (2004) Neurogenesis in a rat model of age-related cognitive decline. *Aging Cell* 3:227-234.
- Bizon JL, Helm KA, Han JS, Chun HJ, Pucilowska J, Lund PK, Gallagher M (2001) Hypothalamic-pituitary-adrenal axis function and corticosterone receptor expression in behaviourally characterized young and aged Long-Evans rats. *Eur J Neurosci* 14:1739-1751.
- Blaner WS, Obunike JC, Kurlandsky SB, al-Haideri M, Piantedosi R, Deckelbaum RJ, Goldberg IJ (1994) Lipoprotein lipase hydrolysis of retinyl ester. Possible implications for retinoid uptake by cells. *J Biol Chem* 269:16559-16565.

- Bliss TV, Lomo T (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 232:331-356.
- Bondareff W, Geinisman Y (1976) Loss of synapses in the dentate gyrus of the senescent rat. *Am J Anat* 145:129-136.
- Bonnet E, Touyarot K, Alfos S, Pallet V, Higuere P, Abrous DN (2008) Retinoic acid restores adult hippocampal neurogenesis and reverses spatial memory deficit in vitamin A deprived rats. *PLoS One* 3:e3487.
- Borel P, Mekki N, Boirie Y, Partier A, Alexandre-Gouabau MC, Grolier P, Beaufrere B, Portugal H, Lairon D, Azais-Braesco V (1998) Comparison of the postprandial plasma vitamin A response in young and older adults. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 53:B133-140.
- Born J, Ditschuneit I, Schreiber M, Dodt C, Fehm HL (1995) Effects of age and gender on pituitary-adrenocortical responsiveness in humans. *Eur J Endocrinol* 132:705-711.
- Boscaro M, Paoletta A, Scarpa E, Barzon L, Fusaro P, Fallo F, Sonino N (1998) Age-related changes in glucocorticoid fast feedback inhibition of adrenocorticotropin in man. *J Clin Endocrinol Metab* 83:1380-1383.
- Boucheron C, Alfos S, Enderlin V, Husson M, Pallet V, Jaffard R, Higuere P (2006) Age-related effects of ethanol consumption on triiodothyronine and retinoic acid nuclear receptors, neurogranin and neuromodulin expression levels in mouse brain. *Neurobiol Aging* 27:1326-1334.
- Bourguet W, Vivat V, Wurtz JM, Chambon P, Gronemeyer H, Moras D (2000) Crystal structure of a heterodimeric complex of RAR and RXR ligand-binding domains. *Mol Cell* 5:289-298.
- Breuner CW, Orchinik M (2002) Plasma binding proteins as mediators of corticosteroid action in vertebrates. *J Endocrinol* 175:99-112.
- Brossaud J, Roumes H, Moisan MP, Pallet V, Redonnet A, Corcuff JB (2013) Retinoids and glucocorticoids target common genes in hippocampal HT22 cells. *J Neurochem*.
- Burke SN, Barnes CA (2006) Neural plasticity in the ageing brain. *Nat Rev Neurosci* 7:30-40.
- Burke SN, Barnes CA (2010) Senescent synapses and hippocampal circuit dynamics. *Trends Neurosci* 33:153-161.

C

- Cai L, Yan XB, Chen XN, Meng QY, Zhou JN (2010) Chronic all-trans retinoic acid administration induced hyperactivity of HPA axis and behavioral changes in young rats. *Eur Neuropsychopharmacol* 20:839-847.
- Cameron HA, Gould E (1994) Adult neurogenesis is regulated by adrenal steroids in the dentate gyrus. *Neuroscience* 61:203-209.
- Cameron HA, McKay RD (2001) Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J Comp Neurol* 435:406-417.
- Cameron HA, Woolley CS, McEwen BS, Gould E (1993) Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience* 56:337-344.
- Carlisle HJ, Fink AE, Grant SG, O'Dell TJ (2008) Opposing effects of PSD-93 and PSD-95 on long-term potentiation and spike timing-dependent plasticity. *J Physiol* 586:5885-5900.
- Casoli T, Di Stefano G, Gracciotti N, Fattoretti P, Solazzi M, Bertoni-Freddari C (2001) Age-related effects of moderate alcohol consumption on GAP-43 levels in rat hippocampus. *Mech Ageing Dev* 122:1723-1738.
- Cassel JC, Duconseille E, Jeltsch H, Will B (1997) The fimbria-fornix/cingular bundle pathways: a review of neurochemical and behavioural approaches using lesions and transplantation techniques. *Prog Neurobiol* 51:663-716.
- Celerier A, Pierard C, Rachbauer D, Sarrieau A, Beracochea D (2004) Contextual and serial discriminations: a new learning paradigm to assess simultaneously the effects of acute stress on retrieval of flexible or stable information in mice. *Learn Mem* 11:196-204.
- Cerqueira JJ, Taipa R, Uylings HB, Almeida OF, Sousa N (2007) Specific configuration of dendritic degeneration in pyramidal neurons of the medial prefrontal cortex induced by differing corticosteroid regimens. *Cereb Cortex* 17:1998-2006.
- Chambon P (1996) A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J* 10:940-954.
- Chambon P (2005) The nuclear receptor superfamily: a personal retrospect on the first two decades. *Mol Endocrinol* 19:1418-1428.
- Chao HM, McEwen BS (1994) Glucocorticoids and the expression of mRNAs for neurotrophins, their receptors and GAP-43 in the rat hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res* 26:271-276.

- Chao HM, Choo PH, McEwen BS (1989) Glucocorticoid and mineralocorticoid receptor mRNA expression in rat brain. *Neuroendocrinology* 50:365-371.
- Chao HM, Sakai RR, Ma LY, McEwen BS (1998) Adrenal steroid regulation of neurotrophic factor expression in the rat hippocampus. *Endocrinology* 139:3112-3118.
- Chaouloff F, Groc L (2011) Temporal modulation of hippocampal excitatory transmission by corticosteroids and stress. *Front Neuroendocrinol* 32:25-42.
- Chauveau F, Pierard C, Tronche C, Coutan M, Drouet I, Liscia P, Beracochea D (2009a) The hippocampus and prefrontal cortex are differentially involved in serial memory retrieval in non-stress and stress conditions. *Neurobiol Learn Mem* 91:447-455.
- Chauveau F, Tronche C, Pierard C, Liscia P, Drouet I, Coutan M, Beracochea D (2010) Rapid stress-induced corticosterone rise in the hippocampus reverses serial memory retrieval pattern. *Hippocampus* 20:196-207.
- Chauveau F, Pierard C, Corio M, Celerier A, Christophe T, Vouimba RM, Guillou JL, Beracochea D (2009b) Mediodorsal thalamic lesions block the stress-induced inversion of serial memory retrieval pattern in mice. *Behav Brain Res* 203:270-278.
- Chen JD, Evans RM (1995) A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* 377:454-457.
- Chen N, Napoli JL (2008) All-trans-retinoic acid stimulates translation and induces spine formation in hippocampal neurons through a membrane-associated RARalpha. *FASEB J* 22:236-245.
- Chen N, Onisko B, Napoli JL (2008) The nuclear transcription factor RARalpha associates with neuronal RNA granules and suppresses translation. *J Biol Chem* 283:20841-20847.
- Chiang MY, Misner D, Kempermann G, Schikorski T, Giguere V, Sucov HM, Gage FH, Stevens CF, Evans RM (1998) An essential role for retinoid receptors RARbeta and RXRgamma in long-term potentiation and depression. *Neuron* 21:1353-1361.
- Cho YH, Giese KP, Tanila H, Silva AJ, Eichenbaum H (1998) Abnormal hippocampal spatial representations in alphaCaMKII286A and CREBalphaDelta- mice. *Science* 279:867-869.
- Christie BR, Cameron HA (2006) Neurogenesis in the adult hippocampus. *Hippocampus* 16:199-207.
- Clelland CD, Choi M, Romberg C, Clemenson GD, Jr., Fragniere A, Tyers P, Jessberger S, Saksida LM, Barker RA, Gage FH, Bussey TJ (2009) A functional role for adult hippocampal neurogenesis in spatial pattern separation. *Science* 325:210-213.

- Cocco S, Diaz G, Stancampiano R, Diana A, Carta M, Curreli R, Sarais L, Fadda F (2002) Vitamin A deficiency produces spatial learning and memory impairment in rats. *Neuroscience* 115:475-482.
- Cohen JW, Louneva N, Han LY, Hodes GE, Wilson RS, Bennett DA, Lucki I, Arnold SE (2011) Chronic corticosterone exposure alters postsynaptic protein levels of PSD-95, NR1, and synaptopodin in the mouse brain. *Synapse* 65:763-770.
- Coleman M (2005) Axon degeneration mechanisms: commonality amid diversity. *Nat Rev Neurosci* 6:889-898.
- Connor MJ, Sidell N (1997) Retinoic acid synthesis in normal and Alzheimer diseased brain and human neural cells. *Mol Chem Neuropathol* 30:239-252.
- Conrad CD, Bimonte-Nelson HA (2010) Impact of the hypothalamic-pituitary-adrenal/gonadal axes on trajectory of age-related cognitive decline. *Prog Brain Res* 182:31-76.
- Conrad CD, Galea LA, Kuroda Y, McEwen BS (1996) Chronic stress impairs rat spatial memory on the Y maze, and this effect is blocked by tianeptine pretreatment. *Behav Neurosci* 110:1321-1334.
- Conrad CD, McLaughlin KJ, Harman JS, Foltz C, Wieczorek L, Lightner E, Wright RL (2007) Chronic glucocorticoids increase hippocampal vulnerability to neurotoxicity under conditions that produce CA3 dendritic retraction but fail to impair spatial recognition memory. *J Neurosci* 27:8278-8285.
- Corcoran J, Maden M (1999) Nerve growth factor acts via retinoic acid synthesis to stimulate neurite outgrowth. *Nat Neurosci* 2:307-308.
- Corcoran JP, So PL, Maden M (2004) Disruption of the retinoid signalling pathway causes a deposition of amyloid beta in the adult rat brain. *Eur J Neurosci* 20:896-902.
- Cosma MP (2002) Ordered recruitment: gene-specific mechanism of transcription activation. *Mol Cell* 10:227-236.
- Crandall J, Sakai Y, Zhang J, Koul O, Mineur Y, Crusio WE, McCaffery P (2004) 13-cis-retinoic acid suppresses hippocampal cell division and hippocampal-dependent learning in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:5111-5116.
- Cullinan WE, Ziegler DR, Herman JP (2008) Functional role of local GABAergic influences on the HPA axis. *Brain Struct Funct* 213:63-72.
- Czeh B, Michaelis T, Watanabe T, Frahm J, de Biurrun G, van Kampen M, Bartolomucci A, Fuchs E (2001) Stress-induced changes in cerebral metabolites, hippocampal volume,

and cell proliferation are prevented by antidepressant treatment with tianeptine. Proc Natl Acad Sci U S A 98:12796-12801.

D

- D'Hooge R, De Deyn PP (2001) Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res Brain Res Rev* 36:60-90.
- Datson NA, Morsink MC, Meijer OC, de Kloet ER (2008) Central corticosteroid actions: Search for gene targets. *Eur J Pharmacol* 583:272-289.
- Dawson HD, Yamamoto Y, Zolfaghari R, Rosales FJ, Dietz J, Shimada T, Li N, Ross AC (2000) Regulation of hepatic vitamin A storage in a rat model of controlled vitamin A status during aging. *J Nutr* 130:1280-1286.
- Dayer AG, Ford AA, Cleaver KM, Yassaee M, Cameron HA (2003) Short-term and long-term survival of new neurons in the rat dentate gyrus. *J Comp Neurol* 460:563-572.
- De Bosscher K (2010) Selective Glucocorticoid Receptor modulators. *J Steroid Biochem Mol Biol* 120:96-104.
- de Hoz L, Moser EI, Morris RG (2005) Spatial learning with unilateral and bilateral hippocampal networks. *Eur J Neurosci* 22:745-754.
- de Kloet ER, Reul JM, Sutanto W (1990) Corticosteroids and the brain. *J Steroid Biochem Mol Biol* 37:387-394.
- de Kloet ER, Joels M, Holsboer F (2005) Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci* 6:463-475.
- de Kloet ER, Karst H, Joels M (2008) Corticosteroid hormones in the central stress response: quick-and-slow. *Front Neuroendocrinol* 29:268-272.
- de Quervain DJ, Roozendaal B, McGaugh JL (1998) Stress and glucocorticoids impair retrieval of long-term spatial memory. *Nature* 394:787-790.
- de Quervain DJ, Aerni A, Schelling G, Roozendaal B (2009) Glucocorticoids and the regulation of memory in health and disease. *Front Neuroendocrinol* 30:358-370.
- de The H, Marchio A, Tiollais P, Dejean A (1989) Differential expression and ligand regulation of the retinoic acid receptor alpha and beta genes. *EMBO J* 8:429-433.
- Delint-Ramirez I, Salcedo-Tello P, Bermudez-Rattoni F (2008) Spatial memory formation induces recruitment of NMDA receptor and PSD-95 to synaptic lipid rafts. *J Neurochem* 106:1658-1668.

- Dellu F, Mayo W, Cherkaoui J, Le Moal M, Simon H (1992) A two-trial memory task with automated recording: study in young and aged rats. *Brain Res* 588:132-139.
- Deng W, Aimone JB, Gage FH (2010) New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat Rev Neurosci* 11:339-350.
- Dickstein DL, Kabaso D, Rocher AB, Luebke JI, Wearne SL, Hof PR (2007) Changes in the structural complexity of the aged brain. *Aging Cell* 6:275-284.
- Dinan TG, Scott LV (2005) Anatomy of melancholia: focus on hypothalamic-pituitary-adrenal axis overactivity and the role of vasopressin. *J Anat* 207:259-264.
- Ding Y, Qiao A, Wang Z, Goodwin JS, Lee ES, Block ML, Allsbrook M, McDonald MP, Fan GH (2008) Retinoic acid attenuates beta-amyloid deposition and rescues memory deficits in an Alzheimer's disease transgenic mouse model. *J Neurosci* 28:11622-11634.
- Dobrossy MD, Drapeau E, Aurousseau C, Le Moal M, Piazza PV, Abrous DN (2003) Differential effects of learning on neurogenesis: learning increases or decreases the number of newly born cells depending on their birth date. *Mol Psychiatry* 8:974-982.
- Dolle P, Ruberte E, Leroy P, Morriss-Kay G, Chambon P (1990) Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins. I. A systematic study of their differential pattern of transcription during mouse organogenesis. *Development* 110:1133-1151.
- Dorey R, Pierard C, Shinkaruk S, Tronche C, Chauveau F, Baudonnat M, Beracochea D (2011) Membrane mineralocorticoid but not glucocorticoid receptors of the dorsal hippocampus mediate the rapid effects of corticosterone on memory retrieval. *Neuropsychopharmacology* 36:2639-2649.
- Drake CT, Milner TA, Patterson SL (1999) Ultrastructural localization of full-length trkB immunoreactivity in rat hippocampus suggests multiple roles in modulating activity-dependent synaptic plasticity. *J Neurosci* 19:8009-8026.
- Dranovsky A, Hen R (2006) Hippocampal neurogenesis: regulation by stress and antidepressants. *Biol Psychiatry* 59:1136-1143.
- Drapeau E, Nora Abrous D (2008) Stem cell review series: role of neurogenesis in age-related memory disorders. *Aging Cell* 7:569-589.
- Drapeau E, Montaron MF, Aguerre S, Abrous DN (2007) Learning-induced survival of new neurons depends on the cognitive status of aged rats. *J Neurosci* 27:6037-6044.

- Drapeau E, Mayo W, Aurousseau C, Le Moal M, Piazza PV, Abrous DN (2003) Spatial memory performances of aged rats in the water maze predict levels of hippocampal neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:14385-14390.
- Drever BD, Riedel G, Platt B (2011) The cholinergic system and hippocampal plasticity. *Behav Brain Res* 221:505-514.
- Driscoll I, Howard SR, Stone JC, Monfils MH, Tomanek B, Brooks WM, Sutherland RJ (2006) The aging hippocampus: a multi-level analysis in the rat. *Neuroscience* 139:1173-1185.
- Duester G (2000) Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function: production of visual pigment and retinoic acid. *Eur J Biochem* 267:4315-4324.
- Duester G (2008) Retinoic acid synthesis and signaling during early organogenesis. *Cell* 134:921-931.
- Dumas TC, Foster TC (1995) Developmental increase in CA3-CA1 presynaptic function in the hippocampal slice. *J Neurophysiol* 73:1821-1828.
- Dunn JF, Nisula BC, Rodbard D (1981) Transport of steroid hormones: binding of 21 endogenous steroids to both testosterone-binding globulin and corticosteroid-binding globulin in human plasma. *J Clin Endocrinol Metab* 53:58-68.
- Dupire A, Kant P, Mons N, Marchand AR, Coutureau E, Dalrymple-Alford J, Wolff M (2013) A role for anterior thalamic nuclei in affective cognition: interaction with environmental conditions. *Hippocampus* 23:392-404.
- Dupret D, Revest JM, Koehl M, Ichas F, De Giorgi F, Costet P, Abrous DN, Piazza PV (2008) Spatial relational memory requires hippocampal adult neurogenesis. *PLoS One* 3:e1959.
- Duprez E, Lillehaug JR, Gaub MP, Lanotte M (1996) Differential changes of retinoid-X-receptor (RXR alpha) and its RAR alpha and PML-RAR alpha partners induced by retinoic acid and cAMP distinguish maturation sensitive and resistant t(15;17) promyelocytic leukemia NB4 cells. *Oncogene* 12:2443-2450.
- Dyall SC, Michael GJ, Michael-Titus AT (2010) Omega-3 fatty acids reverse age-related decreases in nuclear receptors and increase neurogenesis in old rats. *J Neurosci Res* 88:2091-2102.

E

- Edwards CR, Stewart PM, Burt D, Brett L, McIntyre MA, Sutanto WS, de Kloet ER, Monder C (1988) Localisation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase--tissue specific protector of the mineralocorticoid receptor. *Lancet* 2:986-989.
- Eichenbaum H (2004) Hippocampus: cognitive processes and neural representations that underlie declarative memory. *Neuron* 44:109-120.
- Eichenbaum H, Cohen NJ (1988) Representation in the hippocampus: what do hippocampal neurons code? *Trends Neurosci* 11:244-248.
- Eichenbaum H, Stewart C, Morris RG (1990) Hippocampal representation in place learning. *J Neurosci* 10:3531-3542.
- Eichenbaum H, Dudchenko P, Wood E, Shapiro M, Tanila H (1999) The hippocampus, memory, and place cells: is it spatial memory or a memory space? *Neuron* 23:209-226.
- Elfahime E, Felix JM, Koch B (1996) Regulation of corticosteroid-binding globulin synthesis by 1 alpha,25-dihydroxy-vitamin D3 (calcitriol), 9-cis-retinoic acid and triiodothyronine in cultured rat fetal hepatocytes. *J Steroid Biochem Mol Biol* 57:109-115.
- Enderlin V, Alfos S, Pallet V, Garcin H, Azais-Braesco V, Jaffard R, Higuieret P (1997a) Aging decreases the abundance of retinoic acid (RAR) and triiodothyronine (TR) nuclear receptor mRNA in rat brain: effect of the administration of retinoids. *FEBS Lett* 412:629-632.
- Enderlin V, Pallet V, Alfos S, Dargelos E, Jaffard R, Garcin H, Higuieret P (1997b) Age-related decreases in mRNA for brain nuclear receptors and target genes are reversed by retinoic acid treatment. *Neurosci Lett* 229:125-129.
- Enmark E, Gustafsson JA (1996) Orphan nuclear receptors--the first eight years. *Mol Endocrinol* 10:1293-1307.
- Epp JR, Haack AK, Galea LA (2010) Task difficulty in the Morris water task influences the survival of new neurons in the dentate gyrus. *Hippocampus* 20:866-876.
- Erickson CA, Barnes CA (2003) The neurobiology of memory changes in normal aging. *Exp Gerontol* 38:61-69.
- Etchamendy N, Bohbot VD (2007) Spontaneous navigational strategies and performance in the virtual town. *Hippocampus* 17:595-599.
- Etchamendy N, Desmedt A, Cortes-Torrea C, Marighetto A, Jaffard R (2003a) Hippocampal lesions and discrimination performance of mice in the radial maze: sparing or

- impairment depending on the representational demands of the task. *Hippocampus* 13:197-211.
- Etchamendy N, Enderlin V, Marighetto A, Pallet V, Higuieret P, Jaffard R (2003b) Vitamin A deficiency and relational memory deficit in adult mice: relationships with changes in brain retinoid signalling. *Behav Brain Res* 145:37-49.
- Etchamendy N, Enderlin V, Marighetto A, Vouimba RM, Pallet V, Jaffard R, Higuieret P (2001) Alleviation of a selective age-related relational memory deficit in mice by pharmacologically induced normalization of brain retinoid signaling. *J Neurosci* 21:6423-6429.
- Evans RM (2005) The nuclear receptor superfamily: a rosetta stone for physiology. *Mol Endocrinol* 19:1429-1438.

F

- Fanselow MS (2000) Contextual fear, gestalt memories, and the hippocampus. *Behav Brain Res* 110:73-81.
- Feart C, Mingaud F, Enderlin V, Husson M, Alfos S, Higuieret P, Pallet V (2005a) Differential effect of retinoic acid and triiodothyronine on the age-related hypo-expression of neurogranin in rat. *Neurobiol Aging* 26:729-738.
- Feart C, Pallet V, Boucheron C, Higuieret D, Alfos S, Letenneur L, Dartigues JF, Higuieret P (2005b) Aging affects the retinoic acid and the triiodothyronine nuclear receptor mRNA expression in human peripheral blood mononuclear cells. *Eur J Endocrinol* 152:449-458.
- Feng Y, Yu YM, Yin MZ, Hong L, Cai W (2012) Ectopic expression of retinoic acid receptors and change of myocardial structure in the offspring heart with vitamin A deficiency. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 58:309-318.
- Fex GA, Aronsson A, Andersson A, Larsson K, Nilsson-Ehle P (1996) In vivo effects of 13-cis retinoic acid treatment on the concentration of proteins and lipids in serum. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 34:3-7.
- Figurov A, Pozzo-Miller LD, Olafsson P, Wang T, Lu B (1996) Regulation of synaptic responses to high-frequency stimulation and LTP by neurotrophins in the hippocampus. *Nature* 381:706-709.
- Fischer W, Bjorklund A, Chen K, Gage FH (1991) NGF improves spatial memory in aged rodents as a function of age. *J Neurosci* 11:1889-1906.

- Flandreau EI, Ressler KJ, Owens MJ, Nemeroff CB (2012) Chronic overexpression of corticotropin-releasing factor from the central amygdala produces HPA axis hyperactivity and behavioral anxiety associated with gene-expression changes in the hippocampus and paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Psychoneuroendocrinology* 37:27-38.
- Foster TC, Norris CM (1997) Age-associated changes in Ca(2+)-dependent processes: relation to hippocampal synaptic plasticity. *Hippocampus* 7:602-612.
- Frick KM, Baxter MG, Markowska AL, Olton DS, Price DL (1995) Age-related spatial reference and working memory deficits assessed in the water maze. *Neurobiol Aging* 16:149-160.
- Fuchs E, Flugge G, Ohl F, Lucassen P, Vollmann-Honsdorf GK, Michaelis T (2001) Psychosocial stress, glucocorticoids, and structural alterations in the tree shrew hippocampus. *Physiol Behav* 73:285-291.

G

- Geinisman Y, Bondareff W, Dodge JT (1977) Partial deafferentation of neurons in the dentate gyrus of the senescent rat. *Brain Res* 134:541-545.
- Geinisman Y, de Toledo-Morrell L, Morrell F (1986) Loss of perforated synapses in the dentate gyrus: morphological substrate of memory deficit in aged rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:3027-3031.
- Geinisman Y, deToledo-Morrell L, Morrell F, Persina IS, Rossi M (1992) Age-related loss of axospinous synapses formed by two afferent systems in the rat dentate gyrus as revealed by the unbiased stereological disector technique. *Hippocampus* 2:437-444.
- Gerendasy DD, Sutcliffe JG (1997) RC3/neurogranin, a postsynaptic calpacitin for setting the response threshold to calcium influxes. *Mol Neurobiol* 15:131-163.
- Germain P, Staels B, Dacquet C, Spedding M, Laudet V (2006a) Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacol Rev* 58:685-704.
- Germain P, Chambon P, Eichele G, Evans RM, Lazar MA, Leid M, De Lera AR, Lotan R, Mangelsdorf DJ, Gronemeyer H (2006b) International Union of Pharmacology. LX. Retinoic acid receptors. *Pharmacol Rev* 58:712-725.
- Germain P, Chambon P, Eichele G, Evans RM, Lazar MA, Leid M, De Lera AR, Lotan R, Mangelsdorf DJ, Gronemeyer H (2006c) International Union of Pharmacology. LXIII. Retinoid X receptors. *Pharmacol Rev* 58:760-772.

- Giguere V, Ong ES, Segui P, Evans RM (1987) Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid. *Nature* 330:624-629.
- Giguere V, Lyn S, Yip P, Siu CH, Amin S (1990) Molecular cloning of cDNA encoding a second cellular retinoic acid-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:6233-6237.
- Giguere V (1994) Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins: complex interplay in retinoid signaling. *Endocr Rev* 15:61-79.
- Glass CK (1994) Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers. *Endocr Rev* 15:391-407.
- Goncalves MB, Boyle J, Webber DJ, Hall S, Minger SL, Corcoran JP (2005) Timing of the retinoid-signalling pathway determines the expression of neuronal markers in neural progenitor cells. *Dev Biol* 278:60-70.
- Goodman AB, Pardee AB (2003) Evidence for defective retinoid transport and function in late onset Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:2901-2905.
- Goodman T, Trouche S, Massou I, Verret L, Zerwas M, Rouillet P, Rampon C (2010) Young hippocampal neurons are critical for recent and remote spatial memory in adult mice. *Neuroscience* 171:769-778.
- Goodman T, Crandall JE, Nanescu SE, Quadro L, Shearer K, Ross A, McCaffery P (2012) Patterning of retinoic acid signaling and cell proliferation in the hippocampus. *Hippocampus* 22:2171-2183.
- Gould E (1994) The effects of adrenal steroids and excitatory input on neuronal birth and survival. *Ann N Y Acad Sci* 743:73-92; discussion 92-73.
- Gould E, Tanapat P (1999) Stress and hippocampal neurogenesis. *Biol Psychiatry* 46:1472-1479.
- Gould E, Tanapat P, McEwen BS, Flugge G, Fuchs E (1998) Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:3168-3171.
- Gould E, Beylin A, Tanapat P, Reeves A, Shors TJ (1999) Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nat Neurosci* 2:260-265.
- Gray TS, Carney ME, Magnuson DJ (1989) Direct projections from the central amygdaloid nucleus to the hypothalamic paraventricular nucleus: possible role in stress-induced adrenocorticotropin release. *Neuroendocrinology* 50:433-446.
- Green KN, Billings LM, Roozendaal B, McGaugh JL, LaFerla FM (2006) Glucocorticoids increase amyloid-beta and tau pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 26:9047-9056.

- Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, Bornert JM, Argos P, Chambon P (1986a) Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* 320:134-139.
- Green S, Walter P, Greene G, Krust A, Goffin C, Jensen E, Scrace G, Waterfield M, Chambon P (1986b) Cloning of the human oestrogen receptor cDNA. *J Steroid Biochem* 24:77-83.
- Greschik H, Wurtz JM, Sanglier S, Bourguet W, van Dorsselaer A, Moras D, Renaud JP (2002) Structural and functional evidence for ligand-independent transcriptional activation by the estrogen-related receptor 3. *Mol Cell* 9:303-313.
- Groc L, Choquet D, Chaouloff F (2008) The stress hormone corticosterone conditions AMPAR surface trafficking and synaptic potentiation. *Nat Neurosci* 11:868-870.
- Grummer MA, Zachman RD (2000) Interaction of ethanol with retinol and retinoic acid in RAR beta and GAP-43 expression. *Neurotoxicol Teratol* 22:829-836.
- Guzowski JF, Setlow B, Wagner EK, McGaugh JL (2001) Experience-dependent gene expression in the rat hippocampus after spatial learning: a comparison of the immediate-early genes Arc, c-fos, and zif268. *J Neurosci* 21:5089-5098.
- Guzowski JF, Lyford GL, Stevenson GD, Houston FP, McGaugh JL, Worley PF, Barnes CA (2000) Inhibition of activity-dependent arc protein expression in the rat hippocampus impairs the maintenance of long-term potentiation and the consolidation of long-term memory. *J Neurosci* 20:3993-4001.

H

- Hammond GL, Nisker JA, Jones LA, Siiteri PK (1980) Estimation of the percentage of free steroid in undiluted serum by centrifugal ultrafiltration-dialysis. *J Biol Chem* 255:5023-5026.
- Hansson AC, Cintra A, Belluardo N, Sommer W, Bhatnagar M, Bader M, Ganten D, Fuxe K (2000) Gluco- and mineralocorticoid receptor-mediated regulation of neurotrophic factor gene expression in the dorsal hippocampus and the neocortex of the rat. *Eur J Neurosci* 12:2918-2934.
- Haq R, Pfahl M, Chytil F (1991) Retinoic acid affects the expression of nuclear retinoic acid receptors in tissues of retinol-deficient rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:8272-8276.

- Harris AP, Holmes MC, de Kloet ER, Chapman KE, Seckl JR (2013) Mineralocorticoid and glucocorticoid receptor balance in control of HPA axis and behaviour. *Psychoneuroendocrinology* 38:648-658.
- Harrison EH, Hussain MM (2001) Mechanisms involved in the intestinal digestion and absorption of dietary vitamin A. *J Nutr* 131:1405-1408.
- Hartmann M, Heumann R, Lessmann V (2001) Synaptic secretion of BDNF after high-frequency stimulation of glutamatergic synapses. *EMBO J* 20:5887-5897.
- Helmer C, Peuchant E, Letenneur L, Bourdel-Marchasson I, Larrieu S, Dartigues JF, Dubourg L, Thomas MJ, Barberger-Gateau P (2003) Association between antioxidant nutritional indicators and the incidence of dementia: results from the PAQUID prospective cohort study. *Eur J Clin Nutr* 57:1555-1561.
- Henke K (2010) A model for memory systems based on processing modes rather than consciousness. *Nat Rev Neurosci* 11:523-532.
- Hennigan A, Callaghan CK, Kealy J, Rouine J, Kelly AM (2009) Deficits in LTP and recognition memory in the genetically hypertensive rat are associated with decreased expression of neurotrophic factors and their receptors in the dentate gyrus. *Behav Brain Res* 197:371-377.
- Hercberg S, Preziosi P, Galan P, Devanlay M, Keller H, Bourgeois C, Potier de Courcy G, Cherouvrier F (1994) Vitamin status of a healthy French population: dietary intakes and biochemical markers. *Int J Vitam Nutr Res* 64:220-232.
- Herman JP, Renda A, Bodie B (2003) Norepinephrine-gamma-aminobutyric acid (GABA) interaction in limbic stress circuits: effects of reboxetine on GABAergic neurons. *Biol Psychiatry* 53:166-174.
- Herman JP, Larson BR, Speert DB, Seasholtz AF (2001) Hypothalamo-pituitary-adrenocortical dysregulation in aging F344/Brown-Norway F1 hybrid rats. *Neurobiol Aging* 22:323-332.
- Herrero AI, Sandi C, Venero C (2006) Individual differences in anxiety trait are related to spatial learning abilities and hippocampal expression of mineralocorticoid receptors. *Neurobiol Learn Mem* 86:150-159.
- Hinkelmann K, Moritz S, Botzenhardt J, Riedesel K, Wiedemann K, Kellner M, Otte C (2009) Cognitive impairment in major depression: association with salivary cortisol. *Biol Psychiatry* 66:879-885.
- Holland PC, Bouton ME (1999) Hippocampus and context in classical conditioning. *Curr Opin Neurobiol* 9:195-202.

- Hollander D, Dadufalza V (1990) Influence of aging on vitamin A transport into the lymphatic circulation. *Exp Gerontol* 25:61-65.
- Hollenberg SM, Weinberger C, Ong ES, Cerelli G, Oro A, Lebo R, Thompson EB, Rosenfeld MG, Evans RM (1985) Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature* 318:635-641.
- Holmes MC, Yau JL, French KL, Seckl JR (1995) The effect of adrenalectomy on 5-hydroxytryptamine and corticosteroid receptor subtype messenger RNA expression in rat hippocampus. *Neuroscience* 64:327-337.
- Holmes MC, Yau JL, Kotelevtsev Y, Mullins JJ, Seckl JR (2003) 11 Beta-hydroxysteroid dehydrogenases in the brain: two enzymes two roles. *Ann N Y Acad Sci* 1007:357-366.
- Holmes MC, Carter RN, Noble J, Chitnis S, Dutia A, Paterson JM, Mullins JJ, Seckl JR, Yau JL (2010) 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression is increased in the aged mouse hippocampus and parietal cortex and causes memory impairments. *J Neurosci* 30:6916-6920.
- Huang FL, Huang KP, Wu J, Boucheron C (2006) Environmental enrichment enhances neurogranin expression and hippocampal learning and memory but fails to rescue the impairments of neurogranin null mutant mice. *J Neurosci* 26:6230-6237.
- Huang KP, Huang FL, Jager T, Li J, Reymann KG, Balschun D (2004) Neurogranin/RC3 enhances long-term potentiation and learning by promoting calcium-mediated signaling. *J Neurosci* 24:10660-10669.
- Huang P, Chandra V, Rastinejad F (2010) Structural overview of the nuclear receptor superfamily: insights into physiology and therapeutics. *Annu Rev Physiol* 72:247-272.
- Husson M, Enderlin V, Alfos S, Feart C, Higuieret P, Pallet V (2003) Triiodothyronine administration reverses vitamin A deficiency-related hypo-expression of retinoic acid and triiodothyronine nuclear receptors and of neurogranin in rat brain. *Br J Nutr* 90:191-198.
- Husson M, Enderlin V, Alfos S, Boucheron C, Pallet V, Higuieret P (2004) Expression of neurogranin and neuromodulin is affected in the striatum of vitamin A-deprived rats. *Brain Res Mol Brain Res* 123:7-17.
- Husson M, Enderlin V, Delacourte A, Ghenimi N, Alfos S, Pallet V, Higuieret P (2006) Retinoic acid normalizes nuclear receptor mediated hypo-expression of proteins involved in beta-amyloid deposits in the cerebral cortex of vitamin A deprived rats. *Neurobiol Dis* 23:1-10.

J

- Iniguez MA, Morte B, Rodriguez-Pena A, Munoz A, Gerendasy D, Sutcliffe JG, Bernal J (1994) Characterization of the promoter region and flanking sequences of the neuron-specific gene RC3 (neurogranin). *Brain Res Mol Brain Res* 27:205-214.
- Issa AM, Rowe W, Gauthier S, Meaney MJ (1990) Hypothalamic-pituitary-adrenal activity in aged, cognitively impaired and cognitively unimpaired rats. *J Neurosci* 10:3247-3254.
- Izquierdo I, Bevilaqua LR, Rossato JI, da Silva WC, Bonini J, Medina JH, Cammarota M (2008) The molecular cascades of long-term potentiation underlie memory consolidation of one-trial avoidance in the CA1 region of the dorsal hippocampus, but not in the basolateral amygdala or the neocortex. *Neurotox Res* 14:273-294.

J

- Jacobs S, Lie DC, DeCicco KL, Shi Y, DeLuca LM, Gage FH, Evans RM (2006) Retinoic acid is required early during adult neurogenesis in the dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:3902-3907.
- Jacobson L, Sapolsky R (1991) The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Endocr Rev* 12:118-134.
- Jacqmin-Gadda H, Alperovitch A, Montlahuc C, Commenges D, Leffondre K, Dufouil C, Elbaz A, Tzourio C, Menard J, Dartigues JF, Joly P (2013) 20-Year prevalence projections for dementia and impact of preventive policy about risk factors. *Eur J Epidemiol* 28:493-502.
- Jaffard R, Jeantet Y (1981) Posttraining changes in excitability of the commissural path-CA1 pyramidal cell synapse in the hippocampus of mice. *Brain Res* 220:167-172.
- Jaffard R, Vouimba RM, Marighetto A, Garcia R (1996) Long-term potentiation and long-term depression in the lateral septum in spatial working and reference memory. *J Physiol Paris* 90:339-341.
- Jarrard LE (1993) On the role of the hippocampus in learning and memory in the rat. *Behav Neural Biol* 60:9-26.
- Jodar L, Kaneto H (1995) Synaptic plasticity: stairway to memory. *Jpn J Pharmacol* 68:359-387.
- Joels M (2008) Functional actions of corticosteroids in the hippocampus. *Eur J Pharmacol* 583:312-321.

Joels M, Karst H, DeRijk R, de Kloet ER (2008) The coming out of the brain mineralocorticoid receptor. *Trends Neurosci* 31:1-7.

K

Kaczorowski CC, Disterhoft JF (2009) Memory deficits are associated with impaired ability to modulate neuronal excitability in middle-aged mice. *Learn Mem* 16:362-366.

Kadish I, Thibault O, Blalock EM, Chen KC, Gant JC, Porter NM, Landfield PW (2009) Hippocampal and cognitive aging across the lifespan: a bioenergetic shift precedes and increased cholesterol trafficking parallels memory impairment. *J Neurosci* 29:1805-1816.

Kane MA, Napoli JL (2010) Quantification of endogenous retinoids. *Methods Mol Biol* 652:1-54.

Kane MA, Folias AE, Napoli JL (2008a) HPLC/UV quantitation of retinal, retinol, and retinyl esters in serum and tissues. *Anal Biochem* 378:71-79.

Kane MA, Chen N, Sparks S, Napoli JL (2005) Quantification of endogenous retinoic acid in limited biological samples by LC/MS/MS. *Biochem J* 388:363-369.

Kane MA, Folias AE, Wang C, Napoli JL (2008b) Quantitative profiling of endogenous retinoic acid in vivo and in vitro by tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 80:1702-1708.

Kang H, Schuman EM (1995) Long-lasting neurotrophin-induced enhancement of synaptic transmission in the adult hippocampus. *Science* 267:1658-1662.

Karst H, Berger S, Turiault M, Tronche F, Schutz G, Joels M (2005) Mineralocorticoid receptors are indispensable for nongenomic modulation of hippocampal glutamate transmission by corticosterone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:19204-19207.

Kato S, Mano H, Kojima R, Yoshizawa Y, Masushige S (1992a) Retinoid status and RARs expression. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo) Spec No*:477-480.

Kato S, Mano H, Kumazawa T, Yoshizawa Y, Kojima R, Masushige S (1992b) Effect of retinoid status on alpha, beta and gamma retinoic acid receptor mRNA levels in various rat tissues. *Biochem J* 286 (Pt 3):755-760.

Kawaguchi R, Yu J, Honda J, Hu J, Whitelegge J, Ping P, Wiita P, Bok D, Sun H (2007) A membrane receptor for retinol binding protein mediates cellular uptake of vitamin A. *Science* 315:820-825.

- Kee N, Sivalingam S, Boonstra R, Wojtowicz JM (2002) The utility of Ki-67 and BrdU as proliferative markers of adult neurogenesis. *J Neurosci Methods* 115:97-105.
- Keith D, El-Husseini A (2008) Excitation Control: Balancing PSD-95 Function at the Synapse. *Front Mol Neurosci* 1:4.
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH (1997) More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386:493-495.
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH (1998) Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. *J Neurosci* 18:3206-3212.
- Kempermann G, Gast D, Kronenberg G, Yamaguchi M, Gage FH (2003) Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice. *Development* 130:391-399.
- Khorasanizadeh S, Rastinejad F (2001) Nuclear-receptor interactions on DNA-response elements. *Trends Biochem Sci* 26:384-390.
- Kim E, Niethammer M, Rothschild A, Jan YN, Sheng M (1995) Clustering of Shaker-type K⁺ channels by interaction with a family of membrane-associated guanylate kinases. *Nature* 378:85-88.
- Kim JJ, Diamond DM (2002) The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. *Nat Rev Neurosci* 3:453-462.
- Kitabatake Y, Sailor KA, Ming GL, Song H (2007) Adult neurogenesis and hippocampal memory function: new cells, more plasticity, new memories? *Neurosurg Clin N Am* 18:105-113, x.
- Kohara K, Kitamura A, Morishima M, Tsumoto T (2001) Activity-dependent transfer of brain-derived neurotrophic factor to postsynaptic neurons. *Science* 291:2419-2423.
- Kojima M, Takei N, Numakawa T, Ishikawa Y, Suzuki S, Matsumoto T, Katoh-Semba R, Nawa H, Hatanaka H (2001) Biological characterization and optical imaging of brain-derived neurotrophic factor-green fluorescent protein suggest an activity-dependent local release of brain-derived neurotrophic factor in neurites of cultured hippocampal neurons. *J Neurosci Res* 64:1-10.
- Kollen M, Stephan A, Faivre-Bauman A, Loudes C, Sinet PM, Alliot J, Billard JM, Epelbaum J, Dutar P, Jouvenceau A (2010) Preserved memory capacities in aged Lou/C/Jall rats. *Neurobiol Aging* 31:129-142.
- Krezel W, Kastner P, Chambon P (1999) Differential expression of retinoid receptors in the adult mouse central nervous system. *Neuroscience* 89:1291-1300.

- Krugers HJ, Hoogenraad CC, Groc L (2010) Stress hormones and AMPA receptor trafficking in synaptic plasticity and memory. *Nat Rev Neurosci* 11:675-681.
- Kumar S, Sandell LL, Trainor PA, Koentgen F, Duester G (2012) Alcohol and aldehyde dehydrogenases: retinoid metabolic effects in mouse knockout models. *Biochim Biophys Acta* 1821:198-205.
- Kurlandsky SB, Gamble MV, Ramakrishnan R, Blaner WS (1995) Plasma delivery of retinoic acid to tissues in the rat. *J Biol Chem* 270:17850-17857.

L

- Labelle C, Leclerc N (2000) Exogenous BDNF, NT-3 and NT-4 differentially regulate neurite outgrowth in cultured hippocampal neurons. *Brain Res Dev Brain Res* 123:1-11.
- Lacroix A, Bonnard GD, Lippman ME (1984) Modulation of glucocorticoid receptors by mitogenic stimuli, glucocorticoids and retinoids in normal human cultured T cells. *J Steroid Biochem* 21:73-80.
- Landfield PW (1988) Hippocampal neurobiological mechanisms of age-related memory dysfunction. *Neurobiol Aging* 9:571-579.
- Lane MA, Bailey SJ (2005) Role of retinoid signalling in the adult brain. *Prog Neurobiol* 75:275-293.
- Lavery GG, Zielinska AE, Gathercole LL, Hughes B, Semjonous N, Guest P, Saqib K, Sherlock M, Reynolds G, Morgan SA, Tomlinson JW, Walker EA, Rabbitt EH, Stewart PM (2012) Lack of significant metabolic abnormalities in mice with liver-specific disruption of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *Endocrinology* 153:3236-3248.
- Le Doze F, Debruyne D, Albessard F, Barre L, Defer GL (2000) Pharmacokinetics of all-trans retinoic acid, 13-cis retinoic acid, and fenretinide in plasma and brain of Rat. *Drug Metab Dispos* 28:205-208.
- Leclercq, M. and M. Bourgeay-Causse. (1981) Une méthode simple, fiable rapide: dosage simultané du rétinol et du tocophérol sérique par chromatographie liquide haute performance (A simple, reliable fast method: simultaneous proportioning of retinol and serum tocopherol by high performance liquid chromatography). *Revue Institut Pasteur Lyon* 14: 475-496.

- Lee SY, Hwang YK, Yun HS, Han JS (2012) Decreased levels of nuclear glucocorticoid receptor protein in the hippocampus of aged Long-Evans rats with cognitive impairment. *Brain Res* 1478:48-54.
- Leitman DC, Costa CH, Graf H, Baxter JD, Ribeiro RC (1996) Thyroid hormone activation of transcription is potentiated by activators of cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 271:21950-21955.
- Lemaire V, Aurousseau C, Le Moal M, Abrous DN (1999) Behavioural trait of reactivity to novelty is related to hippocampal neurogenesis. *Eur J Neurosci* 11:4006-4014.
- Lemaire V, Koehl M, Le Moal M, Abrous DN (2000) Prenatal stress produces learning deficits associated with an inhibition of neurogenesis in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:11032-11037.
- Lemaire V, Lamarque S, Le Moal M, Piazza PV, Abrous DN (2006) Postnatal stimulation of the pups counteracts prenatal stress-induced deficits in hippocampal neurogenesis. *Biol Psychiatry* 59:786-792.
- Leuner B, Gould E, Shors TJ (2006) Is there a link between adult neurogenesis and learning? *Hippocampus* 16:216-224.
- Leuner B, Mendolia-Loffredo S, Kozorovitskiy Y, Samburg D, Gould E, Shors TJ (2004) Learning enhances the survival of new neurons beyond the time when the hippocampus is required for memory. *J Neurosci* 24:7477-7481.
- Liu S, Wang J, Zhu D, Fu Y, Lukowiak K, Lu YM (2003) Generation of functional inhibitory neurons in the adult rat hippocampus. *J Neurosci* 23:732-736.
- Liu W, Wang J, Sauter NK, Pearce D (1995) Steroid receptor heterodimerization demonstrated in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:12480-12484.
- Lupien SJ, de Leon M, de Santi S, Convit A, Tarshish C, Nair NP, Thakur M, McEwen BS, Hauger RL, Meaney MJ (1998) Cortisol levels during human aging predict hippocampal atrophy and memory deficits. *Nat Neurosci* 1:69-73.

M

- Ma L, Wang S, Tai F, Yuan G, Wu R, Liu X, Wei B, Yang X (2012) Effects of bilobalide on anxiety, spatial learning, memory and levels of hippocampal glucocorticoid receptors in male Kunming mice. *Phytomedicine* 20:89-96.
- Maden M (2002) Retinoid signalling in the development of the central nervous system. *Nat Rev Neurosci* 3:843-853.

- Maden M (2007) Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 8:755-765.
- Maden M, Hind M (2003) Retinoic acid, a regeneration-inducing molecule. *Dev Dyn* 226:237-244.
- Maden M, Ong DE, Summerbell D, Chytil F (1988) Spatial distribution of cellular protein binding to retinoic acid in the chick limb bud. *Nature* 335:733-735.
- Maghsoodi B, Poon MM, Nam CI, Aoto J, Ting P, Chen L (2008) Retinoic acid regulates RARalpha-mediated control of translation in dendritic RNA granules during homeostatic synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:16015-16020.
- Magnusson KR, Scruggs B, Zhao X, Hammersmark R (2007) Age-related declines in a two-day reference memory task are associated with changes in NMDA receptor subunits in mice. *BMC Neurosci* 8:43.
- Maguire C, Casey M, Kelly A, Mullany PM, Lynch MA (1999) Activation of tyrosine receptor kinase plays a role in expression of long-term potentiation in the rat dentate gyrus. *Hippocampus* 9:519-526.
- Maguire EA, Frackowiak RS, Frith CD (1996a) Learning to find your way: a role for the human hippocampal formation. *Proc Biol Sci* 263:1745-1750.
- Maguire EA, Burke T, Phillips J, Staunton H (1996b) Topographical disorientation following unilateral temporal lobe lesions in humans. *Neuropsychologia* 34:993-1001.
- Maguire EA, Burgess N, Donnett JG, Frackowiak RS, Frith CD, O'Keefe J (1998) Knowing where and getting there: a human navigation network. *Science* 280:921-924.
- Mains RE, Eipper BA, Ling N (1977) Common precursor to corticotropins and endorphins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:3014-3018.
- Malik MA, Blusztajn JK, Greenwood CE (2000) Nutrients as trophic factors in neurons and the central nervous system: role of retinoic acid. *J Nutr Biochem* 11:2-13.
- Mangelsdorf DJ (1994) Vitamin A receptors. *Nutr Rev* 52:S32-44.
- Marchand AR, Luck D, DiScala G (2003) Evaluation of an improved automated analysis of freezing behaviour in rats and its use in trace fear conditioning. *J Neurosci Methods* 126:145-153.
- Maren S, Holt W (2000) The hippocampus and contextual memory retrieval in Pavlovian conditioning. *Behav Brain Res* 110:97-108.
- Marighetto A, Etchamendy N, Touzani K, Torrea CC, Yee BK, Rawlins JN, Jaffard R (1999) Knowing which and knowing what: a potential mouse model for age-related human declarative memory decline. *Eur J Neurosci* 11:3312-3322.

- Marill J, Idres N, Capron CC, Nguyen E, Chabot GG (2003) Retinoic acid metabolism and mechanism of action: a review. *Curr Drug Metab* 4:1-10.
- Markowska AL, Breckler SJ (1999) Behavioral biomarkers of aging: illustration of a multivariate approach for detecting age-related behavioral changes. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 54:B549-566.
- Martinez SE, Vaglenova J, Sabria J, Martinez MC, Farres J, Pares X (2001) Distribution of alcohol dehydrogenase mRNA in the rat central nervous system. Consequences for brain ethanol and retinoid metabolism. *Eur J Biochem* 268:5045-5056.
- McCaffery P, Drager UC (1994) High levels of a retinoic acid-generating dehydrogenase in the meso-telencephalic dopamine system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:7772-7776.
- McCaffery P, Drager UC (2000) Regulation of retinoic acid signaling in the embryonic nervous system: a master differentiation factor. *Cytokine Growth Factor Rev* 11:233-249.
- McCaffery P, Zhang J, Crandall JE (2006) Retinoic acid signaling and function in the adult hippocampus. *J Neurobiol* 66:780-791.
- McCaffery PJ, Adams J, Maden M, Rosa-Molinar E (2003) Too much of a good thing: retinoic acid as an endogenous regulator of neural differentiation and exogenous teratogen. *Eur J Neurosci* 18:457-472.
- McDonald RJ, Devan BD, Hong NS (2004) Multiple memory systems: the power of interactions. *Neurobiol Learn Mem* 82:333-346.
- McLaren DS, Mawlayi Z, Downing A (1979) Distribution of vitamin A in human liver. *Proc Nutr Soc* 38:49A.
- Mendel CM (1989) The free hormone hypothesis: a physiologically based mathematical model. *Endocr Rev* 10:232-274.
- Merrill DA, Karim R, Darraq M, Chiba AA, Tuszynski MH (2003) Hippocampal cell genesis does not correlate with spatial learning ability in aged rats. *J Comp Neurol* 459:201-207.
- Michaud K, Forget H, Cohen H (2009) Chronic glucocorticoid hypersecretion in Cushing's syndrome exacerbates cognitive aging. *Brain Cogn* 71:1-8.
- Micheau J, Riedel G, Roloff E, Inglis J, Morris RG (2004) Reversible hippocampal inactivation partially dissociates how and where to search in the water maze. *Behav Neurosci* 118:1022-1032.
- Migaud M, Charlesworth P, Dempster M, Webster LC, Watabe AM, Makhinson M, He Y, Ramsay MF, Morris RG, Morrison JH, O'Dell TJ, Grant SG (1998) Enhanced long-

- term potentiation and impaired learning in mice with mutant postsynaptic density-95 protein. *Nature* 396:433-439.
- Mingaud F, Mormede C, Etchamendy N, Mons N, Niedergang B, Wietrych M, Pallet V, Jaffard R, Krezel W, Higuieret P, Marighetto A (2008) Retinoid hyposignaling contributes to aging-related decline in hippocampal function in short-term/working memory organization and long-term declarative memory encoding in mice. *J Neurosci* 28:279-291.
- Minni AM, Dorey R, Pierard C, Dominguez G, Helbling JC, Foury A, Beracochea D, Moisan MP (2012) Critical role of plasma corticosteroid-binding-globulin during stress to promote glucocorticoid delivery to the brain: impact on memory retrieval. *Endocrinology* 153:4766-4774.
- Misner DL, Jacobs S, Shimizu Y, de Urquiza AM, Solomin L, Perlmann T, De Luca LM, Stevens CF, Evans RM (2001) Vitamin A deprivation results in reversible loss of hippocampal long-term synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:11714-11719.
- Miyakawa T, Yared E, Pak JH, Huang FL, Huang KP, Crawley JN (2001) Neurogranin null mutant mice display performance deficits on spatial learning tasks with anxiety related components. *Hippocampus* 11:763-775.
- Mizoguchi K, Ikeda R, Shoji H, Tanaka Y, Maruyama W, Tabira T (2009) Aging attenuates glucocorticoid negative feedback in rat brain. *Neuroscience* 159:259-270.
- Mobarhan S, Seitz HK, Russell RM, Mehta R, Hupert J, Friedman H, Layden TJ, Meydani M, Langenberg P (1991) Age-related effects of chronic ethanol intake on vitamin A status in Fisher 344 rats. *J Nutr* 121:510-517.
- Mohapel P, Mundt-Petersen K, Brundin P, Frielingsdorf H (2006) Working memory training decreases hippocampal neurogenesis. *Neuroscience* 142:609-613.
- Mohler EG, Browman KE, Roderwald VA, Cronin EA, Markosyan S, Scott Bitner R, Strakhova MI, Drescher KU, Hornberger W, Rohde JJ, Brune ME, Jacobson PB, Rueter LE (2011) Acute inhibition of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type-1 improves memory in rodent models of cognition. *J Neurosci* 31:5406-5413.
- Moisan MP (2010) Genotype-phenotype associations in understanding the role of corticosteroid-binding globulin in health and disease animal models. *Mol Cell Endocrinol* 316:35-41.

- Moisan MP, Seckl JR, Edwards CR (1990) 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase bioactivity and messenger RNA expression in rat forebrain: localization in hypothalamus, hippocampus, and cortex. *Endocrinology* 127:1450-1455.
- Monaco HL (2000) The transthyretin-retinol-binding protein complex. *Biochim Biophys Acta* 1482:65-72.
- Montaron MF, Piazza PV, Aurousseau C, Urani A, Le Moal M, Abrous DN (2003) Implication of corticosteroid receptors in the regulation of hippocampal structural plasticity. *Eur J Neurosci* 18:3105-3111.
- Montaron MF, Drapeau E, Dupret D, Kitchener P, Aurousseau C, Le Moal M, Piazza PV, Abrous DN (2006) Lifelong corticosterone level determines age-related decline in neurogenesis and memory. *Neurobiol Aging* 27:645-654.
- Moras D, Gronemeyer H (1998) The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. *Curr Opin Cell Biol* 10:384-391.
- Moreno S, Farioli-Vecchioli S, Ceru MP (2004) Immunolocalization of peroxisome proliferator-activated receptors and retinoid X receptors in the adult rat CNS. *Neuroscience* 123:131-145.
- Morimoto M, Morita N, Ozawa H, Yokoyama K, Kawata M (1996) Distribution of glucocorticoid receptor immunoreactivity and mRNA in the rat brain: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *Neurosci Res* 26:235-269.
- Morris R (1984) Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 11:47-60.
- Morris RG (2006) Elements of a neurobiological theory of hippocampal function: the role of synaptic plasticity, synaptic tagging and schemas. *Eur J Neurosci* 23:2829-2846.
- Morris RG, Hagan JJ, Rawlins JN (1986a) Allocentric spatial learning by hippocampectomised rats: a further test of the "spatial mapping" and "working memory" theories of hippocampal function. *Q J Exp Psychol B* 38:365-395.
- Morris RG, Garrud P, Rawlins JN, O'Keefe J (1982) Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 297:681-683.
- Morris RG, Anderson E, Lynch GS, Baudry M (1986b) Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* 319:774-776.
- Morsink MC, Steenbergen PJ, Vos JB, Karst H, Joels M, De Kloet ER, Datson NA (2006) Acute activation of hippocampal glucocorticoid receptors results in different waves of gene expression throughout time. *J Neuroendocrinol* 18:239-252.

Moser E, Moser MB, Andersen P (1993) Spatial learning impairment parallels the magnitude of dorsal hippocampal lesions, but is hardly present following ventral lesions. *J Neurosci* 13:3916-3925.

Moser EI, Krobot KA, Moser MB, Morris RG (1998) Impaired spatial learning after saturation of long-term potentiation. *Science* 281:2038-2042.

Moser MB, Moser EI, Forrest E, Andersen P, Morris RG (1995) Spatial learning with a minislab in the dorsal hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:9697-9701.

N

Nagpal S, Saunders M, Kastner P, Durand B, Nakshatri H, Chambon P (1992) Promoter context- and response element-dependent specificity of the transcriptional activation and modulating functions of retinoic acid receptors. *Cell* 70:1007-1019.

Nakashiba T, Cushman JD, Pelkey KA, Renaudineau S, Buhl DL, McHugh TJ, Rodriguez Barrera V, Chittajallu R, Iwamoto KS, McBain CJ, Fanselow MS, Tonegawa S (2012) Young dentate granule cells mediate pattern separation, whereas old granule cells facilitate pattern completion. *Cell* 149:188-201.

Namestkova K, Simonova Z, Sykova E (2005) Decreased proliferation in the adult rat hippocampus after exposure to the Morris water maze and its reversal by fluoxetine. *Behav Brain Res* 163:26-32.

Nilsson M, Perfilieva E, Johansson U, Orwar O, Eriksson PS (1999) Enriched environment increases neurogenesis in the adult rat dentate gyrus and improves spatial memory. *J Neurobiol* 39:569-578.

Nishi M, Kawata M (2006) Brain corticosteroid receptor dynamics and trafficking: Implications from live cell imaging. *Neuroscientist* 12:119-133.

Notarianni E (2013) Hypercortisolemia and glucocorticoid receptor-signaling insufficiency in alzheimer' s disease initiation and development. *Curr Alzheimer Res* 10:714-731.

Novac N, Heinzl T (2004) Nuclear receptors: overview and classification. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 3:335-346.

Nyffeler M, Zhang WN, Feldon J, Knuesel I (2007) Differential expression of PSD proteins in age-related spatial learning impairments. *Neurobiol Aging* 28:143-155.

O

- O'Keefe J, Dostrovsky J (1971) The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res* 34:171-175.
- O'Keefe J, Conway DH (1978) Hippocampal place units in the freely moving rat: why they fire where they fire. *Exp Brain Res* 31:573-590.
- O'Malley B (1990) The steroid receptor superfamily: more excitement predicted for the future. *Mol Endocrinol* 4:363-369.
- Odermatt A, Kratschmar DV (2012) Tissue-specific modulation of mineralocorticoid receptor function by 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases: an overview. *Mol Cell Endocrinol* 350:168-186.
- Oitzl MS, de Kloet ER (1992) Selective corticosteroid antagonists modulate specific aspects of spatial orientation learning. *Behav Neurosci* 106:62-71.
- Olson CR, Mello CV (2010) Significance of vitamin A to brain function, behavior and learning. *Mol Nutr Food Res* 54:489-495.
- Ong DE (1994) Cellular transport and metabolism of vitamin A: roles of the cellular retinoid-binding proteins. *Nutr Rev* 52:S24-31.
- Ono K, Yoshiike Y, Takashima A, Hasegawa K, Naiki H, Yamada M (2004) Vitamin A exhibits potent antiamyloidogenic and fibril-destabilizing effects in vitro. *Exp Neurol* 189:380-392.
- Ou XM, Storrington JM, Kushwaha N, Albert PR (2001) Heterodimerization of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors at a novel negative response element of the 5-HT1A receptor gene. *J Biol Chem* 276:14299-14307.
- Overstreet-Wadiche LS, Westbrook GL (2006) Functional maturation of adult-generated granule cells. *Hippocampus* 16:208-215.

P

- Paez-Pereda M, Kovalovsky D, Hopfner U, Theodoropoulou M, Pagotto U, Uhl E, Losa M, Stalla J, Grubler Y, Missale C, Arzt E, Stalla GK (2001) Retinoic acid prevents experimental Cushing syndrome. *J Clin Invest* 108:1123-1131.
- Pak JH, Huang FL, Li J, Balschun D, Reymann KG, Chiang C, Westphal H, Huang KP (2000) Involvement of neurogranin in the modulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, synaptic plasticity, and spatial learning: a study with knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:11232-11237.

- Pallet V, Azais-Braesco V, Enderlin V, Grolier P, Noel-Suberville C, Garcin H, Higuieret P (1997) Aging decreases retinoic acid and triiodothyronine nuclear expression in rat liver: exogenous retinol and retinoic acid differentially modulate this decreased expression. *Mech Ageing Dev* 99:123-136.
- Pardridge WM, Mietus LJ (1979) Transport of steroid hormones through the rat blood-brain barrier. Primary role of albumin-bound hormone. *J Clin Invest* 64:145-154.
- Pares X, Farres J, Kedishvili N, Duester G (2008) Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families : Medium-chain and short-chain dehydrogenases/reductases in retinoid metabolism. *Cell Mol Life Sci* 65:3936-3949.
- Paskitti ME, McCreary BJ, Herman JP (2000) Stress regulation of adrenocorticosteroid receptor gene transcription and mRNA expression in rat hippocampus: time-course analysis. *Brain Res Mol Brain Res* 80:142-152.
- Patterson SL, Abel T, Deuel TA, Martin KC, Rose JC, Kandel ER (1996) Recombinant BDNF rescues deficits in basal synaptic transmission and hippocampal LTP in BDNF knockout mice. *Neuron* 16:1137-1145.
- Penniston KL, Tanumihardjo SA (2006) The acute and chronic toxic effects of vitamin A. *Am J Clin Nutr* 83:191-201.
- Pepeu G (2004) Mild cognitive impairment: animal models. *Dialogues Clin Neurosci* 6:369-377.
- Perez-Castro AV, Toth-Rogler LE, Wei LN, Nguyen-Huu MC (1989) Spatial and temporal pattern of expression of the cellular retinoic acid-binding protein and the cellular retinol-binding protein during mouse embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:8813-8817.
- Petersen RC (2004) Mild cognitive impairment as a diagnostic entity. *J Intern Med* 256:183-194.
- Petkovich PM (2001) Retinoic acid metabolism. *J Am Acad Dermatol* 45:S136-142.
- Pham K, Nacher J, Hof PR, McEwen BS (2003) Repeated restraint stress suppresses neurogenesis and induces biphasic PSA-NCAM expression in the adult rat dentate gyrus. *Eur J Neurosci* 17:879-886.
- Pierard C, Tronche C, Liscia P, Chauveau F, Beracochea D (2009) Combined effects of acute stress and amphetamine on serial memory retrieval pattern in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 203:463-473.

Q

- Quattrone A, Pascale A, Nogues X, Zhao W, Gusev P, Pacini A, Alkon DL (2001)
Posttranscriptional regulation of gene expression in learning by the neuronal ELAV-like mRNA-stabilizing proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:11668-11673.

R

- Ramakers GM, Pasinelli P, van Beest M, van der Slot A, Gispen WH, De Graan PN (2000)
Activation of pre- and postsynaptic protein kinase C during tetraethylammonium-induced long-term potentiation in the CA1 field of the hippocampus. *Neurosci Lett* 286:53-56.
- Ramaroson H, Helmer C, Barberger-Gateau P, Letenneur L, Dartigues JF (2003) [Prevalence of dementia and Alzheimer's disease among subjects aged 75 years or over: updated results of the PAQUID cohort]. *Rev Neurol (Paris)* 159:405-411.
- Ramirez-Amaya V, Marrone DF, Gage FH, Worley PF, Barnes CA (2006) Integration of new neurons into functional neural networks. *J Neurosci* 26:12237-12241.
- Rao MS, Shetty AK (2004) Efficacy of doublecortin as a marker to analyse the absolute number and dendritic growth of newly generated neurons in the adult dentate gyrus. *Eur J Neurosci* 19:234-246.
- Rastinejad F (2001) Retinoid X receptor and its partners in the nuclear receptor family. *Curr Opin Struct Biol* 11:33-38.
- Reiss M, Dibble CL, Sartorelli AC (1988) Down-regulation of glucocorticoid binding sites by retinoic acid in squamous carcinoma cells resistant to the induction of keratinization by hydrocortisone. *J Invest Dermatol* 91:344-348.
- Rekart JL, Meiri K, Routtenberg A (2005) Hippocampal-dependent memory is impaired in heterozygous GAP-43 knockout mice. *Hippocampus* 15:1-7.
- Reul JM, van den Bosch FR, de Kloet ER (1987a) Differential response of type I and type II corticosteroid receptors to changes in plasma steroid level and circadian rhythmicity. *Neuroendocrinology* 45:407-412.
- Reul JM, van den Bosch FR, de Kloet ER (1987b) Relative occupation of type-I and type-II corticosteroid receptors in rat brain following stress and dexamethasone treatment: functional implications. *J Endocrinol* 115:459-467.

- Richard EM, Helbling JC, Tridon C, Desmedt A, Minni AM, Cador M, Pourtau L, Konsman JP, Mormede P, Moisan MP (2010) Plasma transcortin influences endocrine and behavioral stress responses in mice. *Endocrinology* 151:649-659.
- Riedel G, Micheau J, Lam AG, Roloff EL, Martin SJ, Bridge H, de Hoz L, Poeschel B, McCulloch J, Morris RG (1999) Reversible neural inactivation reveals hippocampal participation in several memory processes. *Nat Neurosci* 2:898-905.
- Rosenzweig ES, Barnes CA (2003) Impact of aging on hippocampal function: plasticity, network dynamics, and cognition. *Prog Neurobiol* 69:143-179.
- Ross AC, Zolfaghari R, Weisz J (2001) Vitamin A: recent advances in the biotransformation, transport, and metabolism of retinoids. *Curr Opin Gastroenterol* 17:184-192.
- Ross AC, Russell RM, Miller SA, Munro IC, Rodricks JV, Yetley EA, Julien E (2009) Application of a key events dose-response analysis to nutrients: a case study with vitamin A (retinol). *Crit Rev Food Sci Nutr* 49:708-717.
- Rousseau GG (1984a) Structure and regulation of the glucocorticoid hormone receptor. *Mol Cell Endocrinol* 38:1-11.
- Rousseau GG (1984b) Control of gene expression by glucocorticoid hormones. *Biochem J* 224:1-12.
- Routtenberg A, Cantalops I, Zaffuto S, Serrano P, Namgung U (2000) Enhanced learning after genetic overexpression of a brain growth protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:7657-7662.
- Rowe A (1997) Retinoid X receptors. *Int J Biochem Cell Biol* 29:275-278.

S

- Sahin M, Karauzum SB, Perry G, Smith MA, Aliciguzel Y (2005) Retinoic acid isomers protect hippocampal neurons from amyloid-beta induced neurodegeneration. *Neurotox Res* 7:243-250.
- Sakai Y, Crandall JE, Brodsky J, McCaffery P (2004) 13-cis Retinoic acid (accutane) suppresses hippocampal cell survival in mice. *Ann N Y Acad Sci* 1021:436-440.
- Sakamuri VP, Ananthathmakula P, Veettil GN, Ayyalasomayajula V (2011) Vitamin A decreases pre-receptor amplification of glucocorticoids in obesity: study on the effect of vitamin A on 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity in liver and visceral fat of WNIN/Ob obese rats. *Nutr J* 10:70.

- Sakimura K, Kutsuwada T, Ito I, Manabe T, Takayama C, Kushiya E, Yagi T, Aizawa S, Inoue Y, Sugiyama H, et al. (1995) Reduced hippocampal LTP and spatial learning in mice lacking NMDA receptor epsilon 1 subunit. *Nature* 373:151-155.
- Salehi A, Delcroix JD, Mobley WC (2003) Traffic at the intersection of neurotrophic factor signaling and neurodegeneration. *Trends Neurosci* 26:73-80.
- Salehi B, Cordero MI, Sandi C (2010) Learning under stress: the inverted-U-shape function revisited. *Learn Mem* 17:522-530.
- Sandi C, Pinelo-Nava MT (2007) Stress and memory: behavioral effects and neurobiological mechanisms. *Neural Plast* 2007:78970.
- Sapolsky RM (1982) The endocrine stress-response and social status in the wild baboon. *Horm Behav* 16:279-292.
- Schaaf MJ, Workel JO, Lesscher HM, Vreugdenhil E, Oitzl MS, de Kloet ER (2001) Correlation between hippocampal BDNF mRNA expression and memory performance in senescent rats. *Brain Res* 915:227-233.
- Scharfman H, Goodman J, Macleod A, Phani S, Antonelli C, Croll S (2005) Increased neurogenesis and the ectopic granule cells after intrahippocampal BDNF infusion in adult rats. *Exp Neurol* 192:348-356.
- Scheibe RJ, Wagner JA (1992) Retinoic acid regulates both expression of the nerve growth factor receptor and sensitivity to nerve growth factor. *J Biol Chem* 267:17611-17616.
- Schinder AF, Gage FH (2004) A hypothesis about the role of adult neurogenesis in hippocampal function. *Physiology (Bethesda)* 19:253-261.
- Schloesser RJ, Manji HK, Martinowich K (2009) Suppression of adult neurogenesis leads to an increased hypothalamo-pituitary-adrenal axis response. *Neuroreport* 20:553-557.
- Schmidt-Hieber C, Jonas P, Bischofberger J (2004) Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. *Nature* 429:184-187.
- Schmitt U, Tanimoto N, Seeliger M, Schaeffel F, Leube RE (2009) Detection of behavioral alterations and learning deficits in mice lacking synaptophysin. *Neuroscience* 162:234-243.
- Schneider EL (1999) Aging in the third millennium. *Science* 283:796-797.
- Scholzen T, Gerdes J (2000) The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 182:311-322.
- Seckl JR (1997) 11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase in the brain: a novel regulator of glucocorticoid action? *Front Neuroendocrinol* 18:49-99.

- Seckl JR, Walker BR (2001) Minireview: 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 - a tissue-specific amplifier of glucocorticoid action. *Endocrinology* 142:1371-1376.
- Selkoe DJ (2002) Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science* 298:789-791.
- Shearer KD, Stoney PN, Morgan PJ, McCaffery PJ (2012) A vitamin for the brain. *Trends Neurosci* 35:733-741.
- Siiteri PK, Murai JT, Hammond GL, Nisker JA, Raymoure WJ, Kuhn RW (1982) The serum transport of steroid hormones. *Recent Prog Horm Res* 38:457-510.
- Silhol M, Bonnichon V, Rage F, Tapia-Arancibia L (2005) Age-related changes in brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase receptor isoforms in the hippocampus and hypothalamus in male rats. *Neuroscience* 132:613-624.
- Singec I, Knoth R, Ditter M, Volk B, Frotscher M (2004) Neurogranin is expressed by principal cells but not interneurons in the rodent and monkey neocortex and hippocampus. *J Comp Neurol* 479:30-42.
- Slavinski EA, Jull JW, Auersperg N (1976) Steroidogenic pathways and trophic response to adrenocorticotrophin of cultured adrenocortical cells in different states of differentiation. *J Endocrinol* 69:385-394.
- Smythe JW, Murphy D, Timothy C, Costall B (1997) Hippocampal mineralocorticoid, but not glucocorticoid, receptors modulate anxiety-like behavior in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 56:507-513.
- Snyder JS, Hong NS, McDonald RJ, Wojtowicz JM (2005) A role for adult neurogenesis in spatial long-term memory. *Neuroscience* 130:843-852.
- Sodhi RK, Singh N (2013) All-trans retinoic acid rescues memory deficits and neuropathological changes in mouse model of streptozotocin-induced dementia of Alzheimer's type. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 40:38-46.
- Somogyi P, Klausberger T (2005) Defined types of cortical interneurone structure space and spike timing in the hippocampus. *J Physiol* 562:9-26.
- Sooy K, Webster SP, Noble J, Binnie M, Walker BR, Seckl JR, Yau JL (2010) Partial deficiency or short-term inhibition of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 improves cognitive function in aging mice. *J Neurosci* 30:13867-13872.
- Soule J, Penke Z, Kanhema T, Alme MN, Laroche S, Bramham CR (2008) Object-place recognition learning triggers rapid induction of plasticity-related immediate early genes and synaptic proteins in the rat dentate gyrus. *Neural Plast* 2008:269097.

- Spencer RL, Miller AH, Stein M, McEwen BS (1991) Corticosterone regulation of type I and type II adrenal steroid receptors in brain, pituitary, and immune tissue. *Brain Res* 549:236-246.
- Squire LR (2004) Memory systems of the brain: a brief history and current perspective. *Neurobiol Learn Mem* 82:171-177.
- Starkman MN, Schteingart DE, Schork MA (1992a) Discordant changes in plasma ACTH and beta-lipotropin/beta-endorphin levels in Cushing's disease patients with depression. *Psychoneuroendocrinology* 17:619-626.
- Starkman MN, Gebarski SS, Berent S, Schteingart DE (1992b) Hippocampal formation volume, memory dysfunction, and cortisol levels in patients with Cushing's syndrome. *Biol Psychiatry* 32:756-765.
- Starkman MN, Giordani B, Gebarski SS, Berent S, Schork MA, Schteingart DE (1999) Decrease in cortisol reverses human hippocampal atrophy following treatment of Cushing's disease. *Biol Psychiatry* 46:1595-1602.
- Steiner B, Kronenberg G, Jessberger S, Brandt MD, Reuter K, Kempermann G (2004) Differential regulation of gliogenesis in the context of adult hippocampal neurogenesis in mice. *Glia* 46:41-52.
- Sundboom J, Olson JA (1984) Effect of aging on the storage and catabolism of vitamin A in mice. *Exp Gerontol* 19:257-265.
- Swaab DF, Bao AM, Lucassen PJ (2005) The stress system in the human brain in depression and neurodegeneration. *Ageing Res Rev* 4:141-194.
- Szanto A, Narkar V, Shen Q, Uray IP, Davies PJ, Nagy L (2004) Retinoid X receptors: X-ploring their (patho)physiological functions. *Cell Death Differ* 11 Suppl 2:S126-143.

T

- Takahashi J, Palmer TD, Gage FH (1999) Retinoic acid and neurotrophins collaborate to regulate neurogenesis in adult-derived neural stem cell cultures. *J Neurobiol* 38:65-81.
- Tanapat P, Hastings NB, Rydel TA, Galea LA, Gould E (2001) Exposure to fox odor inhibits cell proliferation in the hippocampus of adult rats via an adrenal hormone-dependent mechanism. *J Comp Neurol* 437:496-504.
- Teixeira CM, Pomedli SR, Maei HR, Kee N, Frankland PW (2006) Involvement of the anterior cingulate cortex in the expression of remote spatial memory. *J Neurosci* 26:7555-7564.

- Theodosiou M, Laudet V, Schubert M (2010) Erratum to: From carrot to clinic: an overview of the retinoic acid signaling pathway. *Cell Mol Life Sci*.
- Thibault O, Landfield PW (1996) Increase in single L-type calcium channels in hippocampal neurons during aging. *Science* 272:1017-1020.
- Toescu EC, Verkhatsky A, Landfield PW (2004) Ca²⁺ regulation and gene expression in normal brain aging. *Trends Neurosci* 27:614-620.
- Topic B, Willuhn I, Palomero-Gallagher N, Zilles K, Huston JP, Hasenohrl RU (2007) Impaired maze performance in aged rats is accompanied by increased density of NMDA, 5-HT_{1A}, and alpha-adrenoceptor binding in hippocampus. *Hippocampus* 17:68-77.
- Toresson H, Mata de Urquiza A, Fagerstrom C, Perlmann T, Campbell K (1999) Retinoids are produced by glia in the lateral ganglionic eminence and regulate striatal neuron differentiation. *Development* 126:1317-1326.
- Touyarot K, Venero C, Sandi C (2004) Spatial learning impairment induced by chronic stress is related to individual differences in novelty reactivity: search for neurobiological correlates. *Psychoneuroendocrinology* 29:290-305.
- Touyarot K, Bonhomme D, Roux P, Alfos S, Lafenetre P, Richard E, Higuieret P, Pallet V (2013) A Mid-Life Vitamin A Supplementation Prevents Age-Related Spatial Memory Deficits and Hippocampal Neurogenesis Alterations through CRABP-I. *PLoS One* 8:e72101.
- Touzani K, Marighetto A, Jaffard R (2003) Fos imaging reveals ageing-related changes in hippocampal response to radial maze discrimination testing in mice. *Eur J Neurosci* 17:628-640.
- Trapp T, Rupprecht R, Castren M, Reul JM, Holsboer F (1994) Heterodimerization between mineralocorticoid and glucocorticoid receptor: a new principle of glucocorticoid action in the CNS. *Neuron* 13:1457-1462.
- Tronche C, Pierard C, Coutan M, Chauveau F, Liscia P, Beracochea D (2010) Increased stress-induced intra-hippocampus corticosterone rise associated with memory impairments in middle-aged mice. *Neurobiol Learn Mem* 93:343-351.
- Trouche S, Bontempi B, Roullet P, Rampon C (2009) Recruitment of adult-generated neurons into functional hippocampal networks contributes to updating and strengthening of spatial memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:5919-5924.
- Tsien JZ, Huerta PT, Tonegawa S (1996) The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell* 87:1327-1338.

Tyler WJ, Alonso M, Bramham CR, Pozzo-Miller LD (2002) From acquisition to consolidation: on the role of brain-derived neurotrophic factor signaling in hippocampal-dependent learning. *Learn Mem* 9:224-237.

U

Ulrich-Lai YM, Herman JP (2009) Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat Rev Neurosci* 10:397-409.

Umesono K, Murakami KK, Thompson CC, Evans RM (1991) Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D3 receptors. *Cell* 65:1255-1266.

V

Valdenaire O, Maus-Moatti M, Vincent JD, Mallet J, Vernier P (1998) Retinoic acid regulates the developmental expression of dopamine D2 receptor in rat striatal primary cultures. *J Neurochem* 71:929-936.

Vallee M, MacCari S, Dellu F, Simon H, Le Moal M, Mayo W (1999) Long-term effects of prenatal stress and postnatal handling on age-related glucocorticoid secretion and cognitive performance: a longitudinal study in the rat. *Eur J Neurosci* 11:2906-2916.

Van der Borght K, Wallinga AE, Luiten PG, Eggen BJ, Van der Zee EA (2005) Morris water maze learning in two rat strains increases the expression of the polysialylated form of the neural cell adhesion molecule in the dentate gyrus but has no effect on hippocampal neurogenesis. *Behav Neurosci* 119:926-932.

van der Loo B, Labugger R, Aebischer CP, Bachschmid M, Spitzer V, Kilo J, Altwegg L, Ullrich V, Luscher TF (2004) Age-related changes of vitamin A status. *J Cardiovasc Pharmacol* 43:26-30.

VanGuilder HD, Farley JA, Yan H, Van Kirk CA, Mitschelen M, Sonntag WE, Freeman WM (2011) Hippocampal dysregulation of synaptic plasticity-associated proteins with age-related cognitive decline. *Neurobiol Dis* 43:201-212.

Vickers CA, Stephens B, Bowen J, Arbuthnott GW, Grant SG, Ingham CA (2006) Neurone specific regulation of dendritic spines in vivo by post synaptic density 95 protein (PSD-95). *Brain Res* 1090:89-98.

von Bohlen Und Halbach O (2007) Immunohistological markers for staging neurogenesis in adult hippocampus. *Cell Tissue Res* 329:409-420.

W

Walf AA, Frye CA (2007) The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc* 2:322-328.

Wan YJ, Wang L, Wu TC (1994) The expression of retinoid X receptor genes is regulated by all-trans- and 9-cis-retinoic acid in F9 teratocarcinoma cells. *Exp Cell Res* 210:56-61.

Wang TW, Zhang H, Parent JM (2005) Retinoic acid regulates postnatal neurogenesis in the murine subventricular zone-olfactory bulb pathway. *Development* 132:2721-2732.

Watson JB, Szijan I, Coulter PM, 2nd (1994) Localization of RC3 (neurogranin) in rat brain subcellular fractions. *Brain Res Mol Brain Res* 27:323-328.

Werner EA, Deluca HF (2002) Retinoic acid is detected at relatively high levels in the CNS of adult rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282:E672-678.

Wietrzych M, Meziane H, Sutter A, Ghyselinck N, Chapman PF, Chambon P, Krezel W (2005) Working memory deficits in retinoid X receptor gamma-deficient mice. *Learn Mem* 12:318-326.

Williams BJ, Bimonte-Nelson HA, Granholm-Bentley AC (2006) ERK-mediated NGF signaling in the rat septo-hippocampal pathway diminishes with age. *Psychopharmacology (Berl)* 188:605-618.

Wohl CA, Weiss S (1998) Retinoic acid enhances neuronal proliferation and astroglial differentiation in cultures of CNS stem cell-derived precursors. *J Neurobiol* 37:281-290.

Wood ER, Dudchenko PA (2003) Aging, spatial behavior and the cognitive map. *Nat Neurosci* 6:546-548.

Woolf NJ, Milov AM, Schweitzer ES, Roghani A (2001) Elevation of nerve growth factor and antisense knockdown of TrkA receptor during contextual memory consolidation. *J Neurosci* 21:1047-1055.

Wright RL, Conrad CD (2005) Chronic stress leaves novelty-seeking behavior intact while impairing spatial recognition memory in the Y-maze. *Stress* 8:151-154.

Wu G, Fang Y, Lu ZH, Ledeen RW (1998) Induction of axon-like and dendrite-like processes in neuroblastoma cells. *J Neurocytol* 27:1-14.

Wyrwoll CS, Holmes MC, Seckl JR (2011) 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases and the brain: from zero to hero, a decade of progress. *Front Neuroendocrinol* 32:265-286.

y

Yamada K, Nabeshima T (2003) Brain-derived neurotrophic factor/TrkB signaling in memory processes. *J Pharmacol Sci* 91:267-270.

Yamamoto Y, Zolfaghari R, Ross AC (2000) Regulation of CYP26 (cytochrome P450RAI) mRNA expression and retinoic acid metabolism by retinoids and dietary vitamin A in liver of mice and rats. *FASEB J* 14:2119-2127.

Yang N, Schule R, Mangelsdorf DJ, Evans RM (1991) Characterization of DNA binding and retinoic acid binding properties of retinoic acid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:3559-3563.

Yau JL, Seckl JR (2012) Local amplification of glucocorticoids in the aging brain and impaired spatial memory. *Front Aging Neurosci* 4:24.

Yau JL, Noble J, Seckl JR (2011) 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 deficiency prevents memory deficits with aging by switching from glucocorticoid receptor to mineralocorticoid receptor-mediated cognitive control. *J Neurosci* 31:4188-4193.

Yau JL, Hibberd C, Noble J, Seckl JR (2002) The effect of chronic fluoxetine treatment on brain corticosteroid receptor mRNA expression and spatial memory in young and aged rats. *Brain Res Mol Brain Res* 106:117-123.

Yau JL, Olsson T, Morris RG, Meaney MJ, Seckl JR (1995) Glucocorticoids, hippocampal corticosteroid receptor gene expression and antidepressant treatment: relationship with spatial learning in young and aged rats. *Neuroscience* 66:571-581.

Yau JL, Noble J, Kenyon CJ, Hibberd C, Kotelevtsev Y, Mullins JJ, Seckl JR (2001) Lack of tissue glucocorticoid reactivation in 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 knockout mice ameliorates age-related learning impairments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:4716-4721.

Yau JL, McNair KM, Noble J, Brownstein D, Hibberd C, Morton N, Mullins JJ, Morris RG, Cobb S, Seckl JR (2007) Enhanced hippocampal long-term potentiation and spatial learning in aged 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 knock-out mice. *J Neurosci* 27:10487-10496.

Z

- Zetterstrom RH, Simon A, Giacobini MM, Eriksson U, Olson L (1994) Localization of cellular retinoid-binding proteins suggests specific roles for retinoids in the adult central nervous system. *Neuroscience* 62:899-918.
- Zetterstrom RH, Lindqvist E, Mata de Urquiza A, Tomac A, Eriksson U, Perlmann T, Olson L (1999) Role of retinoids in the CNS: differential expression of retinoid binding proteins and receptors and evidence for presence of retinoic acid. *Eur J Neurosci* 11:407-416.
- Zhang QY, Dunbar D, Kaminsky L (2000) Human cytochrome P-450 metabolism of retinals to retinoic acids. *Drug Metab Dispos* 28:292-297.
- Zhao C, Teng EM, Summers RG, Jr., Ming GL, Gage FH (2006) Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *J Neurosci* 26:3-11.
- Zhong WX, Dong ZF, Tian M, Cao J, Xu L, Luo JH (2006) N-methyl-D-aspartate receptor-dependent long-term potentiation in CA1 region affects synaptic expression of glutamate receptor subunits and associated proteins in the whole hippocampus. *Neuroscience* 141:1399-1413.
- Zhou J, Cidlowski JA (2005) The human glucocorticoid receptor: one gene, multiple proteins and diverse responses. *Steroids* 70:407-417.